

RIBAC

REVISTA BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS

SUMÁRIO

Caracterização fisiológica de culturas não monocelulares e monocelulares de espécies de <i>malassezia</i>.....	213
<i>Ana Cristina Barreto Silveira, Neiva Tinti de Oliveira, Rejane Pereira Neves, Olliane Maria Correia Magalhães, Lusinete Acioli de Queiroz</i>	
Physiological characterization of monocellular and not monocellular cultures of the <i>malassezia</i> species	
Determinação de zinco em amostra de urina de 24 horas de pacientes com danos renais pelo método de faas.....	217
<i>Dutra, R.L.; Carasek, E.; Cantos, G.A.</i>	
Zinc determination in 24-hour urine sample of patients with damages renais for the faas method.	
Deteção da incidência de enteroparasitos nas crianças carentes da cidade de Guaçuí - ES.....	221
<i>Juliano Gomes Barreto</i>	
Detention of the incidence of enteroparasites in the devoid children of the city of Guaçuí - ES	
Comparação dos resultados obtidos pelos métodos de contagem por campo e contagem de addis modificada utilizados para a análise do sedimento urinário.....	225
<i>Marco Antonio Costa, Gislaïne Franco de Moura Costa, Jacqueline Plewka Machado, Juliana Lúcia Duarte, Simone Kleckner Jazar, Sabrina Souza Abrantes</i>	
Comparison of the obtained results by the methods of counting by field and addis' modified counting used for the analysis of the urinary sediment	
Avaliação dos níveis das hemoglobinas A2 e Fetal dosadas por HPLC em estudantes hígidos da Universidade Católica de Goiás.....	231
<i>Paulo Roberto de Melo-Reis, José Alexandre Felizola Diniz-Filho, Karla Greick Batista Dias-Penna, Mauro Meira de Mesquita, Sérgio Henrique Nascente Costa, Frank de Souza Castro, Yves Mauro Fernandes Ternes, Cintia do Couto Mascarenhas, Lee Chen Chen</i>	
Evaluation of Fetal and A2 hemoglobin by HPLC in students at Catholic University of Goiás	
Importância da detecção de anticorpos anti-HBc na prevenção da transmissão do vírus da hepatite B (VHB) em bancos de sangue.....	235
<i>Miriam Maria Caetano, Sandra Trevisan Beck</i>	
Importance of anti-HBc antibodies determination in blood transfusion centers to prevent the post-transfusional hepatitis B virus (HBV)	
Vaginose bacteriana em mulheres carentes menopausadas e não menopausadas.....	239
<i>Beatriz Schlatte Hasenack, Ana Karina Miquelão, Audrey de Souza Marquês, Éryka Helena Trapp e Pinheiro, Francielle Ferreira Soares, Mariane Panichi Siqueira & Renata da Silva Diniz</i>	
Bacterial vaginosis in pre-menopausal and pos-menopausal deprived women	
Caracterização dos biofilmes formados em filtros de carvão ativado de sistemas de purificação de água em laboratórios clínicos.....	243
<i>Carlos Henrique Pessôa de Menezes e Silva, Alessandro Pereira Lins, Caroline Sathler Oliveira da Cruz, Wenzel Greenberg, Thomas Stewart</i>	
Characterization of biofilmes formed in filters of activated coal of systems of purification of water in clinical laboratories	
Análise do desempenho da prova de nitritos das tiras reativas de urina para triagem de infecção bacteriana do trato urinário.....	255
<i>Celina Shizue Yoshida, Mary Mayumi Taguti Irie, Rúbia Andréia Falleiros de Pádua, Cinthia Gandolfi Boer, Vera Lúcia Dias Siqueira & Marcia Edilaine Lopes Consolário</i>	
Analysis of the acting of the test of nitrite of the test strip of urine for screen of the urinary tract bacterial infection	
Prevalência de traço falciforme em doadores de sangue da região de Londrina - Paraná.....	259
<i>Carollina Grignani, Cátia L. Amaral, Cristiane A. Yamamoto, Tatiana O. Gonçalves, Denise A. Mashima, Tiemi Matsuo, Aparecida L. Perim, Sandra R. Q. Carvalho, José W. Breganó, Maria Emília Favero</i>	
Sickle cell trait prevalence in blood donors from Londrina area - Paraná	
Soroprevalência de hiv-1/2 entre doadores de sangue de Goiânia-Goiás.....	263
<i>Keury Inácio Gonçalves, Eduardo Martins de Souza, Lorena Sales Modesto, Aline Follador da Fonseca e Keila Correia de Alcântara</i>	
Seroprevalence of hiv- 1/2 among blood donors of Goiânia (Goiás state, Brazil)	
Perfil epidemiológico das infecções hospitalares na Unidade de terapia intensiva Infantil do Hospital de Caridade e Beneficência de Cachoeira do Sul, RS, Brasil.....	267
<i>Vilmar Cláudio Banderó Filho, Cristina Ruedell Reschke, Rosmari Hörner</i>	
Epidemiological profile of nosocomial infections in a pediatric intensive care of Hospital de Caridade e Beneficência de Cachoeira do Sul, RS, Brazil	
Análise da incidência de parasitoses intestinais no município de Paraíba do Sul, RJ.....	271
<i>JSarah Carvalho Baptista, Júlia Maria Mendonça Breguez, Manoel Carlos Pereira Baptista, Gilberto Marcelo Sperandio da Silva e Roberta Olmo Pinheiro</i>	
Analysis of intestinal parasites incidence in the city of Paraíba do Sul, RJ	
Histoplasmose clássica: Revisão.....	275
<i>Thais Ferrarelli Rossini & Letícia Silveira Goulart</i>	
Classic histoplasmosis: Review	
Valores de hemácias, plaquetas, leucócitos totais e das subpopulações dos linfócitos em recém-nascidos com sepse e sadios.....	281
<i>Alaide da Silva Pitombeira; José Ajax Nogueira Queiroz & Talapala G. Naidu</i>	
Values of red blood cells, platelets, total leukocytes and lymphocyte subpopulations in septic and healthy newborns	
Avaliação de concentrados plaquetários produzidos pelo Serviço de Hemoterapia do Hospital Santo Ângelo: implantação de um sistema de controle de qualidade.....	287
<i>Giliane Dorneles Guerin, Lisiane Piltz Burtet</i>	
Evaluation of the platelet concentrates produced for the Hemotherapy Service of Santo Ângelo Hospital: Implantation of a system of quality control	

4

VOLUME 38

2006

Caracterização fisiológica de culturas não monocelulares e monocelulares de espécies de *Malassezia**

Physiological characterization of monocellular and not monocellular cultures of the *Malassezia* species

Ana Cristina Barreto Silveira¹, Neiva Tinti de Oliveira², Rejane Pereira Neves³, Oliane Maria Correia Magalhães⁴ & Lusinete Acioli de Queiroz⁵

RESUMO - De culturas não monocelulares e monocelulares de *M. furfur*, *M. restricta* e *M. sympodialis*, foram analisadas as características fisiológicas: crescimento a 37° C e atividades de protease e de fosfolipase. Para obtenção de culturas monocelulares foram realizadas suspensões a 10⁻⁵, correspondendo a 0,0 a 0,3 células sem brotação por campo; dessas suspensões foi semeado 0,1 ml em ágar Sabouraud + 2% de azeite para obtenção das culturas. A confirmação taxonômica foi realizada tanto nas culturas não monocelulares quanto nas monocelulares das três espécies. Foi utilizado ágar Sabouraud + 2% de azeite para o crescimento a 37° C; leite desnatado "Molico" para a atividade proteásica; gema de ovo para atividade fosfolipásica. Todas as culturas não monocelulares e monocelulares das três espécies cresceram a 37° C; considerando a atividade de protease e de fosfolipase houve diferenças expressivas entre culturas não monocelulares e monocelulares de cada uma das três espécies testadas. Os resultados obtidos indicam que em uma amostra pura de espécies de *Malassezia* existem diferentes biótipos que são detectados apenas na condição monocelular, sobretudo nos casos em que determinada característica não se manifesta nas culturas originais, não monocelulares.

PALAVRAS-CHAVE - *Malassezia* spp., culturas monocelulares, crescimento a 37° C, protease, fosfolipase.

SUMMARY - Of not monocellular and monocellular cultures of *Malassezia furfur*, *M. sympodialis* and *M. restricta*, had been analyzed the physiological characteristics: growth 37° C and activities of protease and phospholipase. For attainment of monocellular cultures suspensions had been carried through the 10⁻⁵, corresponding the 0,0 and 0,3 cells without sprout for field; of these suspensions 0.1 ml in Sabouraud agar was sowed + 2% of olive oil for attainment of the cultures. The taxonomic confirmation was carried through in such a way in the not monocellular cultures how much in the monocellular ones of the three species. Sabouraud agar + 2% of olive oil for the growth at 37° C; skimmed milk "Molico" for the proteasic activity; egg yolk for phospholipasic activity were used. All the not monocellular and monocellular cultures of the three species had grown at 37° C; considering the activity of protease and phospholipase it had expressives differences between not monocellular and monocellular cultures of each one of the three tested species. The gotten results indicate that in one it shows pure of species of *Malassezia* exist different biotypes that are detected only in the monocellular condition, over all in the cases where determined characteristic not if manifest in the original cultures, not monocellular.

KEYWORDS - *Malassezia* spp., monocellulars cultures, grew at 37° C, protease, phospholipase.

INTRODUÇÃO

O gênero *Malassezia* constitui-se de espécies de leveduras, na maioria, lipodependentes que fazem parte da microbiota da pele humana. São isoladas de áreas ricas em glândulas sebáceas, particularmente do tórax, costas e cabeça. São também associadas com diversas doenças cutâneas, incluindo dermatite atópica, foliculite, pitiríase versicolor e dermatite seborréica e por isso, são consideradas importantes leveduras de interesse médico (ASPIROZ *et al.*, 1999; DIAZ *et al.*, 2000; MAKIMURA *et al.*, 2000; BOTTEREL *et al.*, 2001; ASHBEE; EVANS, 2002; FAERGEMANN, 2002; LACAZ *et al.*, 2002).

De acordo com Fisher; Cook, (2001) a temperatura influencia na atividade dos fungos, sendo esta característica, um dos parâmetros mais importantes, que predominam sobre todas as atividades dos microrganismos. O crescimento de microrganismos a 37°C revela a capacidade dos mesmos de se desenvolverem no organismo humano e, sendo assim, pode ser considerado um fator de patogenicidade (McDONALD; ODDS, 1993; NEDER, 1992).

Alguns autores mencionam que a habilidade de certos fungos crescerem a 37°C e de produzirem determinadas enzimas como urease, fosfolipase, lipase e protease, pode estar

associada à patogenicidade. Estas enzimas são responsáveis pela propagação do fungo no hospedeiro, facilitando a invasão, através da degradação da pele ou mucosa (ECHE-TEBU; ONONGBU, 1992; NEDER, 1992; MCDONALD; ODDS, 1993; HANEL *et al.*, 1995; KHOZEL, 1995; VIDOTTO *et al.*, 1998). Determinantes de patogenicidade, específicos para leveduras têm sido levantados com o objetivo de produzir novas drogas antifúngicas (MAYSER *et al.*, 1996; FUSAKAWA; KAGAYA, 1997), entre estes, crescimento a 37°C e atividades enzimáticas de fosfolipase e de protease. Para verificar a atividade de diversas enzimas normalmente são utilizadas técnicas de difusão em ágar com o uso de meios sólidos, sendo os resultados expressados pela formação de halos, resultantes da hidrólise dos substratos específicos ou pela mudança de cor do indicador contido no meio de cultura (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975; PRICE; WILKINSON; GENTRY, 1982).

As enzimas proteolíticas fazem parte do sistema metabólico de um grande número de organismos vivos, podendo ser isoladas de animal, vegetal ou de microrganismos e são classificadas como proteinases e peptidases (NUNES, 1998).

A maioria das proteases é detectada qualitativamente "in vitro" utilizando-se como substratos meios sólidos contendo caseína, gelatina, soro de albumina bovina e outras pro-

Recebido em 05/05/2005

Aprovado em 31/07/2006

*Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Micologia.

¹Doutora em biologia de Fungos, Departamento de Micologia, ²Professora do curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Departamento de Micologia, UFPE,

³Professora do curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Departamento de Micologia, UFPE, ⁴Professora do Departamento de Micologia, UFPE, ⁵Professora do curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos Departamento de Micologia, UFPE.

teínas. A atividade proteolítica pode ser constatada pela formação de halos de hidrólise em torno das colônias do microrganismo (McDONALD, 1984; NUNES, 1998).

A caseína, em condições normais, é insolúvel. Quando hidrolisada por uma enzima extracelular, a casease, é transformada em produtos solúveis por um processo chamado peptonização. A presença dessa enzima é evidenciada facilmente pela inoculação do microrganismo na superfície de ágar-leite. Podemos visualizar, nesses casos, ao redor das colônias zonas hialinas, em contraste com o restante do meio que continua turvo (NEDER, 1992).

As fosfolipases são enzimas hidrolíticas que degradam fosfolipídeos em quatro diferentes sítios, dependendo do local de ação da enzima sobre o substrato (WEETE, 1974; PRICE; CAWSON, 1977).

Price et al. (1982) verificaram em seus estudos que a gema do ovo comum possui grandes quantidades de fosfolipídeos, principalmente a fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina, sendo assim os mesmos sugeriram o método de "poor plate" para a detecção de atividade fosfolipásica, utilizando gema de ovo esterilizada (Difco). A atividade de fosfolipase positiva é determinada por uma zona de fosfolipase (PZ) que seria determinada pelo diâmetro da colônia dividido pela soma do diâmetro da colônia com a zona de precipitação (halo). O método demonstrado por estes autores para a detecção de fosfolipase é simples, seguro e reprodutível.

A pesquisa a respeito do metabolismo dos fosfolipídeos foi estimulada pelo fato de que a hemólise provocada pelos venenos de animais está associada à degradação da lecitina que possui complexa estrutura química e oferece diferentes pontos de ataque e é possível que a hidrólise da mesma ocorra com o auxílio de enzimas diferentes chamadas inicialmente de lecitinases, embora outros fosfolipídeos também sejam substratos apropriados, no entanto, conforme a nomenclatura adotada por alguns autores estas enzimas são chamadas de fosfolipases que por convenção foram designadas pelas letras A, B, C e D (DENNIS, 1983 apud MELO, 1990; PRICE; CAWSON, 1977).

Mayser et al. (1996) concluíram que as fosfolipases são capazes de invadir e danificar a membrana do hospedeiro, bem como de manter uma relação com alta taxa de mortalidade em experimentos com animais apresentando determinantes de patogenicidade.

Riciputo et al. (1996) detectaram atividade de fosfolipase em oito amostras de *Malassezia furfur* isoladas de pacientes com pitiríase versicolor.

Este trabalho teve por objetivo caracterizar culturas não monocelulares e monocelulares de espécies de *Malassezia*, quanto ao crescimento a 37° C, atividade de protease e de fosfolipase.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas as espécies *M. furfur*, *M. restricta* e *M. sympodialis*. As amostras foram obtidas da Coleção de Cultura de Fungos Micoteca – URM, Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco. Para reativação das amostras, foi utilizado caldo glicosado e para manutenção, ágar Sabouraud, ambos os meios adicionados de 2% de azeite e de 0,5% de extrato de levedura, contidos em tubos de ensaio. Os meios foram preparados segundo Lacaz et al. (2002). Para garantir a pureza das amostras, foram preparadas suspensões em 2 mL de água destilada esterilizada, com 1% de Tween 80 e 50 mg/L de cloranfenicol; de cada suspensão, 0,2 mL foram plaqueados em ágar Sabouraud adi-

cionado de azeite e de 50 mg/L de cloranfenicol. As colônias surgidas isoladamente foram repicadas para o meio ágar Sabouraud adicionado de azeite e contido em tubos de ensaio, para posterior confirmação das espécies.

As amostras permaneceram incubadas a 37°C por até sete dias e posteriormente mantidas a temperatura ambiente (T.A. 28°C ± 1 °C) .

OBTENÇÃO DAS CULTURAS MONOCELULARES

Das culturas originais não monocelulares foram preparadas suspensões com 10 mL de água destilada esterilizada adicionada de 1% de Tween 80. Depois da homogeneização, foram feitas diluições sucessivas até uma concentração final de 10⁻⁵. Nesta concentração a microscopia revelou a presença de no máximo 3.0 células sem brotamento por campo das lâminas examinadas. Em seguida, e em triplicata, foi semeado 0,1 mL por espalhamento radial na superfície do meio ágar Sabouraud adicionado de 2% de azeite e de 1% de Tween 80 contido em placas, as quais foram incubadas à 37°C por até sete dias. As colônias desenvolvidas foram analisadas quanto a macroscopia e microscopia. Dentre as colônias análogas, de pontos equidistantes, foram repicadas três colônias, denominadas de A, B e C para confirmação da espécie, assim como determinação de características fisiológicas. Todas as etapas posteriores à obtenção de culturas monocelulares foram realizadas simultaneamente com culturas originais e culturas monocelulares.

Para confirmação das espécies *M. furfur*, *M. restricta* e *M. sympodialis*, foram adotados os procedimentos preconizados por Guillot et al. (1996).

CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS

CRESCIMENTO A 37°C

Para verificar o crescimento a 37°C, as culturas foram semeadas, em ágar Sabouraud adicionado de 2% de azeite contido em tubos de ensaio; as culturas foram semeadas em triplicata; três tubos foram incubados a 37°C e três mantidos a T.A.(28°C ± 1°C). O crescimento comparativo foi acompanhado por até sete dias.

DETECÇÃO DE ENZIMAS

Para detecção das enzimas protease e fosfolipase, os testes foram realizados em triplicata; culturas jovens com 72 horas de crescimento foram suspensas em 3 mL de água destilada esterilizada. Swab previamente esterilizado foi imerso na suspensão e tocado no centro da superfície do meio contido em placas; três placas foram incubadas a 37°C e três mantidas a T. A.(28°C ± 1°C). A produção de protease e de fosfolipase, foi constatada através da formação de halos em torno da cultura.

DETECÇÃO DE PROTEASE

A detecção de protease foi realizada através da hidrólise da caseína no meio contendo leite desnatado "Molico" e ágar segundo Lacaz et al. (2002). Depois de semeadas, as amostras foram observadas quanto ao crescimento e atividade enzimática, através da formação de halo, durante um período de 10 a 15 dias. Quando positivas para a detecção de protease, ocorria a formação de halo transparente ao redor das colônias. Para confirmar a produção da enzima, foi utilizada a solução acidificada de cloreto de mercúrio. O índice enzimático foi estimado pela diferença entre o diâmetro do halo formado e o diâmetro da colônia. A ausência de halo indicou ausência de atividade de protease.

DETECÇÃO DE FOSFOLIPASE

A atividade fosfolipásica foi detectada segundo o método descrito por Price *et al.* (1982), no qual é utilizado o seguinte meio: ágar Sabouraud + gema de ovo + cloreto de sódio + cloreto de cálcio + 2% de azeite. pH final 6.5

As culturas foram observadas quanto ao crescimento e a formação de halos. O halo foi medido em milímetros, correspondendo aos cálculos da zona de precipitação (Pz), relacionados ao diâmetro da colônia. Foi utilizada a seguinte fórmula:

$$Pz = \frac{\text{Ø da colônia}}{\text{Ø da colônia} + \text{zona de precipitação}}$$

Pz = Precipitação; Pz = 1, a atividade é Negativa; Pz < 1, a atividade é positiva; Ø = diâmetro da colônia; Zona de precipitação = halo formado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CRESCIMENTO A 37° C

A temperatura ambiente (28° C ± 1° C), e a 37° C, as amostras originais e monocelulares das espécies analisadas, cresceram bem, não havendo diferenças entre as mesmas (Tabela 1).

Resultados semelhantes são referidos por Ashbee *et al.* (1993); Bergbrant; Faergemann (1988); Faergemann (1998); Imwidthaya *et al.* (1989); Guého *et al.* (1996); Sunenshine *et al.* (1998), os quais verificaram um bom crescimento a 37° C por amostras de espécies de *Malassezia*.

ATIVIDADE DE PROTEASE E DE FOSFOLIPASE

Em relação a atividade de protease e de fosfolipase, os resultados variaram entre as amostras originais e monocelulares (Tabela 1).

TABELA I
Crescimento, atividade de protease e de fosfolipase detectadas em amostras originais e monocelulares de espécies de *Malassezia*.

Acesso	Espécies	Crescimento		Atividade			
		TA.	37°C	Protease		Fosfolipase	
URM		TA.	37°C	TA.	37°C	TA.	37°C
3867	<i>M. furfur</i> O	+	+	-	-	+	+
	<i>M. furfur</i> A	+	+	+	+	-	+
	<i>M. furfur</i> B	+	+	+	+	-	+
	<i>M. furfur</i> C	+	+	-	-	+	-
3870	<i>M. restricta</i> O	+	+	+	+	+	+
	<i>M. restricta</i> A	+	+	+	+	-	+
	<i>M. restricta</i> B	+	+	-	-	-	+
	<i>M. restricta</i> C	+	+	+	+	-	-
3873	<i>M. furfur</i> O	+	+	-	-	+	-
	<i>M. furfur</i> A	+	+	-	-	+	-
	<i>M. furfur</i> B	+	+	-	+	-	-
	<i>M. furfur</i> C	+	+	+	+	-	+
3875	<i>M. furfur</i> O	+	+	-	-	-	+
	<i>M. furfur</i> A	+	+	-	-	-	-
	<i>M. furfur</i> B	+	+	-	-	-	-
	<i>M. furfur</i> C	+	+	-	-	-	+
3878	<i>M. sympodialis</i> O	+	+	+	+	+	-
	<i>M. sympodialis</i> A	+	+	-	-	+	-
	<i>M. sympodialis</i> B	+	+	-	-	-	-
	<i>M. sympodialis</i> C	+	+	+	+	-	+

O = original
A, B e C = Monocelulares
T.A. = temperatura ambiente (28° C ± 1° C)
+ = crescimento a 37°C e atividade enzimática detectada
- = atividade enzimática não detectada

A atividade proteásica foi detectada a T. A. e a 37°C com as amostras: monocelulares A e B 3867 de *M. furfur*; original O e monocelulares A e C 3870 de *M. restricta*; monocelular C 3873 de *M. furfur*; original O e monocelular C 3878 de *M. sympodialis*. Com a amostra monocelular B 3873 de *M. furfur*, desta atividade, foi expressada apenas a 37° C. Com as demais amostras não foi detectada atividade de protease, o diâmetro dos halos variou de 0,1 cm a 1,7 cm. A permanência do halo após a adição da solução acidificada de cloreto de mercúrio, indicou que o mesmo foi formado em consequência da assimilação da caseína do leite. Os estudos de Muhsin *et al.* (1997) sobre a atividade de enzimas extracelulares em meio sólido, não indicaram atividade de protease com amostras de *Malassezia*, diferindo dos resultados obtidos neste trabalho.

A atividade de fosfolipase foi detectada a T. A. e a 37° C com as amostras: originais O 3867 de *M. furfur* e 3870 de *M. restricta*. Apenas a 37° C esta atividade foi detectada nas amostras: monocelulares A e B 3867 de *M. furfur*; A e B 3870 de *M. restricta*, C 3878 de *M. sympodialis*; original O e monocelular C 3875 de *M. furfur*. Apenas a T. A., a amostra monocelular C 3867, original O e monocelular A 3873 *M. furfur*; original O e monocelular A 3878 de *M. sympodialis*. Com as demais amostras não foi detectada atividade fosfolipásica. O diâmetro dos halos variou de 0,1 cm a 3,0 cm. A formação de halo com diâmetro < 1 indicou atividade de fosfolipase. Esta atividade por espécies de *Malassezia*, foi detectada também por Kantarcioglu; Yucel, 2002; Mancianti *et al.* (2000); Muhsin *et al.* (1997); Riciputo *et al.* (1996).

Nas condições em que este trabalho foi desenvolvido, nem todas as amostras de *Malassezia* expressam atividade proteásica e ou fosfolipásica.

Os resultados obtidos indicam que numa amostra original pura pode haver diferentes biótipos, que poderão expressar resultados diferentes dos obtidos com a amostra original da espécie. Portanto, a depender da característica fisiológica dos biótipos, os resultados podem variar. A expressão de protease e de fosfolipase foi variável no conjunto das amostras originais e monocelulares das espécies testadas.

Na literatura consultada, não há referências sobre trabalhos com culturas monocelulares de *Malassezia*, nem com diferentes parâmetros.

A análise dos resultados obtidos com as culturas originais e monocelulares de uma mesma amostra, indica que características fisiológicas podem variar na amostra. Conseqüentemente, em Coleções, devem ser depositadas culturas originais e monocelulares da espécie.

Este é o primeiro trabalho desenvolvido com culturas monocelulares de espécies de *Malassezia*.

REFERÊNCIAS

- Ashbee, H. R., *et al.* The Carriage of *Malassezia furfur* serovars A B and C in patients with pityriasis versicolor seborrheic dermatitis and controls. *British Journal of Dermatology*, 129 : 533/540, 1993.
- Ashbee, H. R. & Evans, E. G. V. Immunology of diseases associated with *Malassezia* species. *Clin. Microbiol. Rev.* 15 : 21-57, 2002.
- Aspiroz, C.; Moreno, L. A.; Rezusta, A.; Rubio, C. Differentiation of three biotypes of *Malassezia* species on human normal skin. Correspondence with *M. Globosa*, *M. sympodialis* and *M. restricta*. *Mycopathologia*. 145 : 69-74, 1999.
- Bergbrant, I. M. ; Faergemann, J. Variations of *Pityrosporum orbiculare* in Middle-aged and Elderly Individuals. *Acta Derm Venereol (Stoekb)*. 68 : 537-540, 1988.
- Botterel, F; Desterke, C.; Bretagne, S. Analysis of microsatellite markers of

- Candida albicans* used for rapid typing. *J. Clin. Microbiol.* 39 : 4076-4081, 2001
6. Dennis, E. A. Phospholipases. In: BYED, P. D. (ed). *The enzymes*. New York: Academic Press, 1983. 6 : 307-353.
 7. Diaz, M. R.; Boekhout, T.; Theelen, B.; Fell, J. W. Molecular sequence analyses of the intergenic spacer (IGS) associated With rDNA of the two varieties of the pathogenic yeast, *Cryptococcus neoformans*. *Syst. Appl. Microbiol.* 23 : 535-545, 2000.
 8. Echetebe, C.O. & Ononogbu, I. C. Extracellular lipase and proteinase of *Basidiobolus haptosporus*: possible role in subcutaneous mycosis. *Mycopathologia.* 80 : 171-177, 1992.
 9. Faergemann, J. The role of *Malassezia* species in the ecology of human skin and as pathogens. *Medical Mycology.* 36 : 220-229, 1998.
 10. Faergemann, J. Atopic dermatitis and fungi. *Clin. Microbiol.* 15 : 545-563, 2002.
 11. Fuzakawa, Y.; Kagaya, K. Molecular bases adhesion of *Candida albicans*. *J. Med. Vet.* 67 : 597-607, 1997.
 12. Guh o, E.; Midgley, G.; Guillot, J. The Genus *Malassezia* with description of four new species. *Antony Leeuwenhoek.* 69 : 337-355, 1996.
 13. Guillot, J.; Guh o, E.; Le Sourd, M.; Midgley, G.; Chevrier, G.; Dupont, B. Identification of *Malassezia* species. *J. Mycol. Med.* 6 : 103-110, 1996.
 14. Hanel, H.; Kirs, R.; Schmidts, H. New systematically active antimycoticos from the betablochercategory. *Mycoses.* 38 : 251-264, 1995.
 15. Imwidththaya, P.; Thianprasit, M.; Smiruang, S. A study of pityriasis versicolor in Bangkok (Thailand). *Mycopathology.* 105 : 157-161, 1989.
 16. Kantarcioglu, A. S.; Yucel, A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses.* 45 : 160-165, 2002.
 17. Khozel, T. R. Virulence factors of *Cryptococcus neoformans*. *Trends Microbiology.* 3 : 295-299, 1995.
 18. Lacaz, C. Da S.; Porto, E.; Martins, J. E. C. *Micologia Médica: fungos, actinomicetes e algas de interesse médico.* 9^o ed., São Paulo: Sarvier EDUSP, 2002, 695.
 19. Mcdonald, F. Secretion of inducible proteinase by pathogenic *Candida* species. *Sabouraudia.* 22 : 79-92, 1984.
 20. Macdonald, F.; Odds, F. C. Virulence for mice of a proteinase secreting strain of *Candida albicans* and a proteinase deficient mutant. *Journal of general Microbiology.* 129 : 431-438, 1993.
 21. Makimura, K.; Tamura, Y.; Kudo, M.; Uchida, K.; Saito, H. Yamaguchi, H. Species identification and strain typing of *Malassezia* species stock strains and clinical isolates based on the DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. *J. Med. Microbiol.* 49 : 29-35, 2000.
 22. Mancianti, F.; Rum, A.; Nardoni, S.; Corazza, M. Extracellular enzymatic activity of *Malassezia* spp. Isolates. *Mycopathologia.* 149 : 131-135, 2000.
 23. Mayser, P.; Laabs, S.; Hever, K.; Gruder, K. Detection of extracellular phospholipase activity in *Candida albicans* and *Rhodotorula rubra*. *Mycopathology.* 135 : 149-155, 1996.
 24. Muhsin, T. M.; Aubaid, A. H.; Al-Duboon, A. H. Extracellular enzyme activities of dermatophytes and yeast isolates on solid media. *Mycoses.* 40 : 465-469, 1997.
 25. Neder, R. N. *Microbiologia: Manual de Laboratório.* São Paulo. Ed. Nobel, p. 81, 88-90, 95-98, 1992.
 26. Nunes, A. T. Espécies de *Cladosporium* Link ex fr: de interesse médico isolados do solo e de vegetais de áreas de lazer da cidade do Recife, PE, Brasil. 1998. 69f. Disserta o (Mestrado em Biologia de fungos)- Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1998.
 27. Price, M. F.; Cawson, R. A. Phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia.* 5 : 179-185, 1977.
 28. Price, M. F.; Wilkinson, I. D.; Gentry, L. O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia.* 0 : 7-14, 1982.
 29. Riciputo, R. M.; Olivieri, S.; Micali, G.; Sapuppo, A. Phospholipase activity in *Malassezia furfur* pathogenic strains. *Mycoses.* 39 : 233-235, 1996.
 30. Sunenshine, P. J.; Schwartz, R. A.; Janning, C. K. *Tinea versicolor.* *Int. J. Dermatol.* 37 : 648-655, 1998.
 31. Vidotto, V.; Leone, R.; Sinicco, A.; Itokuwa, S.; Criseo, G. Comparison of phospholipase production in *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients and bord droppings. *Mycopathologia.* .. 142, :71-76, 1998.
 32. Weete, J. D. *Fungal lipid biochemistry: distribution and metabolism.* New York: Plenum Press, 1974.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Ana Cristina Barreto Silveira
 Rua Pedrin poles, 863 Apt^o 403 Edifício Forte Orange
 Jaboatão dos Guararapes- Piedade – PE CEP: 54.430/131
 E-mail: acbsrw@ig.com.br
 FONES: 81 9224-4679 ; 3468-0807

34^o Congresso Brasileiro de Análises Clínicas 7^o Congresso Brasileiro de Citologia Clínica

10 a 14 de junho de 2007

Local:
 Centro de Conven es - EXPOMINAS
 Belo Horizonte - MG



Promo o e Realiza o
SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS

Determinação de zinco em amostra de urina de 24 horas de pacientes com danos renais pelo método de Faas

Zinc determination in 24-hour urine sample of patients with damages renais for the Faas method

Dutra, R.L.¹; Carasek, E.² & Cantos, G.A.³

RESUMO - O método de espectrometria de absorção atômica é uma técnica analítica que permite determinar elementos em pequenas quantidades. Neste trabalho o zinco (Zn) foi determinado por este método, utilizando a técnica de adição do analito, em 16 amostras de urina de 24 horas, de pacientes com patologias renais. Foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica Varian Spectra AA 50, equipado com atomizador em chama. As análises dos resultados mostraram que quando a urina foi diluída 1:20 e tratada com 50µL de surfactante Triton X 114, eliminou-se as interferências de matriz. O procedimento foi validado pela análise de material de referência Seronorm™ Elemento traço em urina e teste de recuperação por adição, onde o valor esperado era 0,45 µg/mL e o encontrado foi 0,46 µg/mL, com recuperação média de 99% e limite de detecção (µg/mL) de (0,18). Observou-se que 9 amostras estavam acima dos valores de referência que é 300-600 µgZn/24horas, sendo observado que apenas 2 amostras estavam abaixo deste valor. Observou-se ainda que os valores estavam concordantes com a literatura, pois na maioria das amostras quando o paciente era portador de patologia renal a excreção de Zn estava aumentada. Esses resultados demonstram que o zinco pode ser determinado por espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS), e que a determinação de Zn em urina é um fator importante para auxiliar o diagnóstico de patologias renais.

PALAVRAS-CHAVE - Zinco; Urina; doenças renais; FAAS.

SUMMARY - The method of spectrometry of atomic absorption is one analytical technique that allows to determine elements in small amounts. In this work the zinc (Zn) was determined by this method, having used the technique of addition of the analito, in 16 24-hour urine samples, of patients with renal pathology. A spectrometer of atomic absorption Varian Spectra AA 50 was used, equipped with atomizer in flame. The analyses of the results had shown that when urine was diluted 1:20 and treated with 50µL to surfactante Triton X 114, eliminated the matrix interferences. The procedure was validated by the analysis of material of Seronorm™ reference Element trace in urine and test of recovery for addition, where the expected value was 0,46 µg/mL and the joined one was 0,45µg/mL, with average recovery of 99% and limit of detention (µg/mL) of (0,18). It was observed that 9 samples were above of the values of referen-ce that is 300-600 µgZn/24horas, being observed that only 2 samples were below of this value. It was still observed that the values we-re concordant with literature, therefore in the majority of the samples when the patient one was carrying of renal pathology the ex-cresção of Zn was increased. These results demonstrate that the zinc can be determined by spectrometry of atomic absorption in flame (FAAS), and that the determination of Zn in urine is a factor important to assist the diagnosis of renal pathology.

KEYWORDS - Zinc; urine; renal disease; FAAS

INTRODUÇÃO

O zinco (Zn) é o segundo mineral mais abundante em animais e plantas, sendo considerado um microelemento ou oligoelemento, frente às pequenas quantidades presentes nos diversos organismos. No humano é encontrado no líquido intracelular das células do fígado, dos rins, dos ossos e dos músculos esqueléticos. É absorvido passivamente por meio de ligantes complexos, endógenos e exógenos (Histidina, ácido cítrico e ácido picolínico) no duodeno e jejuno. Apresenta excreção fecal em quase sua totalidade, e uma mínima parte pelos rins. Contudo, em patologias como cirrose hepática, alcoolismo, inanição, doenças renais e diabetes, há um aumento da excreção urinária de Zn⁽¹⁾.

É um elemento traço antioxidante pelo fato de ser componente da enzima superóxido dismutase, que protege contra danos de radicais livres, que são moléculas contendo um ou mais elétrons desemparelhados na sua órbita externa⁽²⁾.

Apesar dos metais traços estarem amplamente distribuídos nas fontes alimentares, é muito freqüente a deficiência de Zn em humanos. O baixo consumo de alimentos ricos deste mineral biodisponível, como carnes vermelhas, e o alto consumo de alimentos ricos em inibidores da absorção desse elemento traço, como fitatos, certas fibras e cálcio, podem causar deficiência do mesmo no nosso organismo^(3,4).

O progresso referente ao conhecimento dos aspectos, clíni-

cos e bioquímicos, em relação à deficiência severa e moderada de Zn é muito discutido, sendo que ainda existem dificuldades de diagnosticar a deficiência marginal desse mineral devido a problemas na avaliação do estado nutricional em relação a esse elemento. A concentração de Zn no plasma pode apresentar-se diminuída em casos de estresse temporário de várias origens, sem relação com a deficiência de zinco propriamente dito⁽⁵⁾.

Essa deficiência também pode ocorrer em muitos processos patológicos ou mesmo uma desordem de origem genética onde pode levar à diminuição na absorção, na utilização e a perda deste elemento. Sua deficiência inclui retardo no crescimento, hipogonadismo em homens, disfunção imunológica célula-mediadora e alterações de pele⁽⁶⁾. O enfraquecimento neurofisiológico é um dos severos resultados potenciais dessa deficiência, pois este elemento é um metal de transição, essencial para atividade e controle neuronal de doenças neuronais, tendo sido relatado em várias doenças humanas neurodegenerativas⁽⁷⁾.

Alguns elementos exibem alta toxicidade em muito baixa concentração, e igualmente elementos essenciais podem causar efeitos deletérios em altas concentrações. Adicionalmente, anormalidades do metabolismo de certos elementos estão envolvidos em muitas doenças humanas. Desta forma, o monitoramento do estado corporal de elementos traço tem recebido maior atenção de investigadores biomédicos⁽⁸⁾.

Recebido em 11/07/2005

Aprovado em 25/04/2006

¹Aluna de doutorado do Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC. CEP: 88040900.

²Prof. Dr do Departamento de Química UFSC

³Prof(a) Dr (a) do Departamento de Análises Clínicas, UFSC.

O zinco é também um elemento de especial interesse na pediatria, por ser requerido nos processos enzimáticos, no metabolismo de ácidos nucleicos e na síntese de proteína. Sua deficiência em crianças e adolescentes vem sendo indicada como uma das possíveis causas de retardamento no crescimento e desenvolvimento sexual ⁽⁹⁾.

Existem muitas situações em que a excreção de zinco está diminuída. Estudos feitos com minerais, elementos traço em atletas e durante a atividade física foi observado que o Zn está diminuído na urina nas patologias pós-traumáticas em atletas, defendendo a teoria de que este mineral está sendo redistribuído para reparar danos nos tecidos ⁽¹⁰⁾.

Zorbas *et al.* (2001), analisando Zn no plasma, na urina e nas fezes, verificou que a redução deste metal nestes fluidos biológicos está associada a uma diminuição da massa muscular durante a Hipocinesia prolongada (diminuição dos movimentos) ⁽¹¹⁾.

Bedescu, *et al.*, (1998), estudando o efeito protetor do zinco em nefropatia diabética de ratos observaram que o zinco realmente exerce um efeito benéfico nesses pacientes e que o mecanismo pelo qual o zinco protege ratos diabéticos de complicações renais e que é devido principalmente a seu estado antioxidante ⁽¹²⁾.

Devido à disfunção renal alguns elementos podem ser acumulados no organismo (alumínio, cromo, silício e estrôncio), e outros podem ser excretados (selênio, bromo, zinco, lítio e cério) ⁽¹³⁾.

A análise de urina é muitas vezes usada para monitorar a exposição ocupacional e ao meio ambiente para elementos traços. Portanto ela é a mais utilizada para avaliar fluido biológico, porque a maior parte dos elementos traço são excretados por esta via, principalmente em patologias renais ⁽⁸⁾. Assim a proposta do presente trabalho foi determinar Zn em amostras de urina humana, pela técnica de calibração por adição do analito e espectrometria de absorção atômica em chama, objetivando auxiliar o diagnóstico de patologias renais por meio dos resultados obtidos por esta técnica.

MATERIAL E MÉTODOS

Equipamentos

A análise de Zn foi realizada em um espectrômetro de absorção atômica Varian Spectra AA 50, equipado com atomizador em chama e lâmpada de cátodo oco para zinco. Foram utilizados os seguintes parâmetros operacionais: comprimento de onda de 213,9 nm; corrente máxima da lâmpada 5mA; chama ar/acetileno e fenda espectral 1,0 nm.

Foi utilizado também nessa pesquisa amostra certificada SeronormTM trace elements in urine (Lote 403125, número 1362) de Nycomed Pharma (Billingstad, Norway) para checar a exatidão e validação do método analítico proposto. Foi fornecido na forma liofilizada e reconstituída dissolvendo o conteúdo total em 5 ml de água deionizada de alta pureza. Foi utilizada também uma centrífuga (Marca Fanem) para centrifugar as amostras de urina e descartar fragmentos celulares.

Metodologia

Foram selecionadas para este estudo, 16 amostras de urina de 24 horas, cedidas pelo laboratório de análises clínicas do Hospital Universitário – UFSC, as quais foram estocadas a - 20 °C até o momento das análises.

Preparo da amostra

As amostras de urina de 24 horas foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos e diluídas 1:20 com água deioni-

zada no momento das análises, para minimizar prováveis interferências de matriz (11), da qual se utilizou 0,25 ml de urina para determinação de zinco.

Foi realizado um tratamento com 50 µl de Triton X-114 (Sigma Chemical, Alemanha), para se eliminar a absorção molecular, ou seja, presença de macromoléculas presentes na amostra que alteram o sinal analítico (15, 16).

Preparo da curva de calibração

As soluções foram preparadas empregando-se água deionizada proveniente de um sistema de purificação de água Milli-Q[®] da Millipore[®] (Bedford, MA, USA). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

Foi selecionado o método de adição do analito para este estudo devido à interferência de matriz observada.

Para a construção da curva de calibração com adição do analito, cinco alíquotas da solução amostra teste diluída 1:20 foram retiradas, sendo que em uma delas o analito não foi adicionado, enquanto as demais foram adicionados volumes crescentes utilizando-se uma solução padrão de zinco a 10 µg/mL (Fluka Chemic GmbH – CH – 9471) para um volume final de 1ml como ilustrado na Tabela 1.

TABELA I

Curva de calibração para determinação de zinco na urina, obtida pela técnica de adição do analito.

Amostra (mL)	Padrão de Zinco 10 ppm	
	Concentração (µg/mL)	Volume (µL)
1	0	0
1	0,5	50
1	1,0	100
1	1,5	150
1	2,0	200

RESULTADO E DISCUSSÃO

As doenças renais são causas importantes de morbidade e mortalidade, principalmente entre os idosos, representando sérias implicações para a saúde pública.

A análise de zinco na urina proporciona um teste direto para a identificação do excesso, deficiência ou má distribuição fisiológica destes elementos no corpo, e pode fornecer preciosas pistas para o diagnóstico e tratamento de várias patologias com as doenças renais.

Assim, considerando a necessidade de aprimorar os mecanismos de atendimento aos pacientes com doenças renais, neste trabalho foi desenvolvido uma metodologia para análise de zinco em amostras de urinas com o objetivo de buscar novas soluções para o diagnóstico dessas doenças. Para análise do zinco utilizou-se a técnica de espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS), que fornece resultados em partes por milhão (ppm), o que equivale 0,0001% ^(14,17).

O método de espectrometria de absorção atômica é uma técnica analítica para determinação de elementos em pequenas quantidades. É baseada na absorção de energia de radiação por átomos livres. Na absorção em chama a amostra é pulverizada dentro da chama na forma de um aerossol formado através de um nebulizador. A chama mais usada é ar/acetileno. Para uma faixa de 30 elementos oferece um ambiente adequado e uma temperatura suficiente ^(14, 17).

A técnica de adição do analito consiste em obter um número de alíquotas em replicatas de amostra, adicionar nelas gradativamente quantidades conhecidas do analito (soluções de calibração) e diluir para o mesmo volume. Uma das alíquotas é diluída somente com o solvente, sendo que essa contém zero de analito adicionado. Uma série de soluções obtidas desta forma serve como um conjunto de soluções de calibração. Quando os valores de absorbância de cada solução são plotados versus a concentração do analito adicionado, uma curva de calibração é obtida que intercepta o eixo da absorbância em valores maiores do que zero. A subtração da concentração do analito é realizada extrapolando a curva de calibração para interceptar o eixo da concentração negativa ⁽¹⁴⁾.

O risco de interferências de ions está presente para todos os elementos químicos analisados em qualquer amostra biológica e a urina é uma delas. O problema causado pela interferência não-espectral depende da natureza da amostra, ou seja, da constituição da matriz, sendo assim, o problema pode ser reduzido pela simples diluição da amostra ⁽¹⁰⁾.

A urina é uma das matrizes mais complexas para se trabalhar em absorção atômica, pois contém concentração elevada de proteínas e compostos inorgânicos que causam importantes interferências espectrais, portanto se faz necessário o uso de diluição e calibração com padrão interno para se eliminar esses interferentes presentes na amostra.

Neste trabalho, a absorção molecular foi observada após vários testes, portanto houve a necessidade de um tratamento da urina com um surfactante (desproteinizante), onde se optou pelo Triton X-114 ^(15,16).

As curvas de calibração foram construídas com emprego de cinco amostras de calibração para a técnica com adição do analito, com leituras em triplicata, plotando-se o sinal analítico obtido versus concentração e massa.

Foi utilizado para este estudo, um equipamento Varian Spectra AA 50, e observamos que quando foram plotadas as absorbâncias versus a concentração em µg/mL, obtive-se um gráfico para cada amostra, e por meio da equação das retas pode-se calcular a concentração de Zn, como pode ser observado na Tabela 2.

TABELA II

Resultados de Zn das amostras de urina obtidas pelo método de adição do analito em µgZn/24 horas.

Amostra	Método de Adição do analito (µgZn/mL)	Método de Adição do analito (µgZn/24 horas)	Amostra	Método de Adição do analito (µgZn/mL)	Método de Adição do analito (µgZn/24 horas)
1	0,61 ± 0,11	698 ± 121	9	0,51 ± 0,1	715 ± 79
2	1,59 ± 0,07	1896 ± 83	10	0,40 ± 0,02	376 ± 19
3	0,18 ± 0,02	513 ± 57	11	0,68 ± 0,05	503 ± 39
4	0,84 ± 0,09	487 ± 53	12	0,66 ± 0,03	1346 ± 66
5	0,17 ± 0,02	187 ± 21	13	0,95 ± 0,09	1316 ± 128
6	0,67 ± 0,03	1818 ± 41	14	1,4 ± 0,08	2575 ± 147
7	0,69 ± 0,01	444 ± 5,8	15	0,93 ± 0,05	1918 ± 95
8	0,33 ± 0,01	211 ± 6,5	16	1,0 ± 0,05	2900 ± 195

Como pode ser visto na Tabela 2, nove amostras estavam acima e duas abaixo dos valores estipulados pela literatura que é de 300 a 600 µgZn/24horas (4). Estes resultados estão concordantes com o esperado, pois pacientes com danos renais apresentam maior liberação de zinco na urina (13). Como todos os pacientes apresentam problemas re-

nais, pode-se deduzir que àqueles com baixos valores eram pacientes com menores danos renais.

Shimoniak *et al.*, (1998), analisando urina de 24 horas de pacientes com nefropatias diabéticas, observaram que os pacientes com diabetes Tipo II apresentaram maior excreção urinária de zinco (987,7 ± 508,3µg) do que os que apresentavam diabetes Tipo I (504,0 ± 167,4µg), e concluíram que diabetes Tipo II pode ser maior risco para deficiência relativa de zinco ⁽¹⁸⁾.

A Figura 1 mostra que dos pacientes analisados 56% estavam excretando valores acima do estipulado pela literatura, vindo a confirmar o que foi citado anteriormente, onde se observa que quando está instalada qualquer disfunção renal, a liberação de zinco e outros minerais, estão alterados. Quanto aos pacientes que apresentaram valores abaixo dos valores de referência (13%), provavelmente deve-se a casos de deficiências de zinco na dieta, ou casos de estresse. Em relação aos 31% dos pacientes que foi observado valores normais para zinco na urina, supõe-se tratar de pacientes em tratamento ou com controle alimentar.

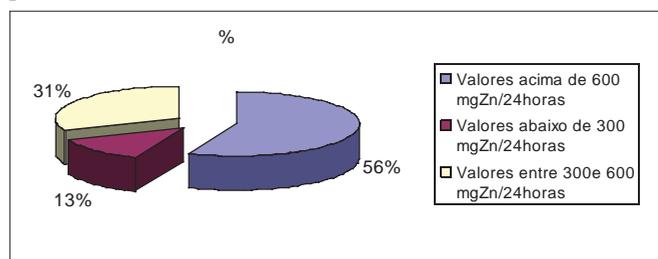


Figura 1. Porcentagem de pacientes que apresentaram valores de zinco acima dos valores estipulados pela literatura que é de 300 a 600 mgZn/24horas.

Figura 1. Porcentagem de pacientes que apresentaram valores de zinco acima dos valores estipulados pela literatura que é de 300 a 600 mgZn/24horas.

Neste trabalho para validação da metodologia, foi realizado também a determinação de Zn e teste de recuperação da amostra certificada SeronormTM elemento traço e em urina (Lote 403125, número 1362) pelo método de calibração por adição do padrão, onde foi encontrado 0,46 µg/mL, e o valor esperado era 0,45 µg/mL. O teste de recuperação pode ser observado na Tabela 3.

Tabela III

Teste de recuperação da amostra certificada de urina SeronormTM elemento traço em urina Lote 403125; Número - 1362.

Leitura	Concentração esperada*	Concentração encontrada*	Recuperação (%)
0,0391	0,0027	0,0027	100
0,0965	0,5027	0,5122	102
0,1540	1,0027	1,050	105
0,1986	1,5027	1,4679	98
0,2601	2,0027	2,0435	102

Os valores de Zn adicionados foram recuperados nas amostras investigadas, mostrando que a metodologia desenvolvida pode ser aplicada na determinação de Zn nas amostras de urina de 24 horas.

O limite de detecção (LOD) foi calculado considerando a variabilidade de 10 medidas consecutivas de 0,01% (w/v) Triton X -114 como solução branco de acordo com (3S/m), onde S é o desvio padrão das medidas do branco e m é o

coeficiente angular da curva de calibração. Foi obtido um valor de 0,18 µg/mL.

Szpunar 1997, analisando Zn em amostras de urina de 24 horas, utilizou o método de recuperação em quatro materiais certificados e observou que os resultados mostraram boa concordância entre os valores certificados e os valores obtidos (10).

Conclui-se que o zinco pode ser determinado na urina de 24 horas em pacientes com patologias renais, pelo método de espectrometria de absorção atômica em chama, pela técnica de calibração por adição do padrão, obtendo-se boa sensibilidade, podendo ser utilizado para auxiliar o diagnóstico de doenças renais bem como de outras patologias que interferem na excreção deste metal.

REFERÊNCIAS

1. www.fugesp.org.br/Revista/Nutrição- acessado em outubro de 2003.
2. Clarkson, P.M.; Thompson, H. Antioxidants: What role do they play in physical activity and health? *Amer. J. Clin Nutrition*, v.72, p. 637-46, 2000.
3. Sandstead, H.H. Causes of iron and zinc deficiencies and their effects on brain. *J. Nutrition*, v. 130, p. 243-262, 2001.
4. Gibson, R.S.; Heath, A.L.; Limbaga, M.L.; Prosser, N.; Skeaff, C.M. Are changes in food consumption patterns associated with lower biochemical zinc status among women from Dunedin, New Zealand? *British J. Nutrition*, v. 86, p. 71-80, 1990.
5. Kazapi, I.A.M. & Tramonti, V.L.C.G. *Nutrição do Atleta*. Ed. UFSC. Florianópolis, 2003.
6. El Hendy, H. A.; Yousef, M. J.; El Naga N. L. A. Effect of dietary zinc deficiency on hematological and biochemical parameters and concentrations of zinc, copper, and iron in growin rats. *Toxicol.*, v. 167, p. 163-170, 2001.
7. Giralt, M.; Molinero, A.; Carrasco, J.; Hidalgo, J. Effect of dietary zinc deficiency on brain metallothionein - I and III mRNA levels during stress and inflammation. *Neurochem. International*. v. 36, p. 555- 562, 2000.
8. Wang, J.; Hansen, E.H.; Gammelgaard, B. Flow injection on-line dilution for multi-element determination in human urine with detection by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta*, v.55, p. 117-126, 2001.
9. Menezes, M. Â. B. C.; Sabino, C. V. S.; Amaral, A. M.; Mattos, S. V. M.; Filho, S. B. S. ko-NAA applied to certified reference materials and hair samples: evaluation of exposure level in a galvanising industry. *J. Radioanalytical Nuclear Chem.*, v.245, n.1, 173 - 178, 2000.
10. Szpunar, J.; Bettmer, J.; Robert, M.; Chassaigne, H.; Cammann, K.; Lobinski, R.; Donard, O.FX. Validation of the determination of copper and zinc in blood plasma and urine by ICP MS with cross-fow and direct injection nebulization. *Talanta*, v. 44, p. 1389-1396, 1997.
11. Zorbas, Y.G.; Kakurin, J.; Charapahkin, K.P.; Yarullin, V. L.; Matvedev, S.N. Zinc measuments during hypokinesia and zinc supplementation in determining zinc retention during hypokinesia in normal subjects. *Nutrition Res*, v.23, p.869-878, 2003.
12. Bedescu, M.; Colev, V.; Paduraru, J.; Vornicu, M.; Mocanu, V.; Ciocoiu, M.; Chicu, M.; Bohotin C. and Mustata T. Zinc protecting effects on diabetic nephropathy, *Pathophysiol*, v. 5, n.1, p. 173, 1998.
13. Scancar, J.; Milacic, R.; Benedik, M.; and Krizaj, I. Total metal concentrations in serum of dialysis patients and fractionation of Cu, Rb, Al, Fe and Zn in spent continuous ambulatory peritoneal dialysis fluids. *Talanta*, v.59, p. 355-364, 2003.
14. Welz, B.; Sperling, M. "Atomic absorption spectrometry", 3ª Ed., Weinheim: VHC, cap.2, 1999.
15. Maniasso, N. *Ambientes micelares em química analítica*. *Quim. Nova*, v.24, n.1, p.87-93, 2001.
16. Brusca, J.S. and Radolf, J.D. Isolation of integral membrane proteins by phase partitioning with Triton X-114 Meth. *Enzymol*. v. 228, p. 182-93, 1994.
17. Lajunen, L.H.J. *Spectrochemical analysis by atomic absorption and emission*. Ed.The Roy. Soc. Chem. Cap. 4, Cambridge, 1992.
18. Shimoniak M. T. and Seaborn C. D. Dietary Zinc Intake and Urinary Zinc Excretion in Diabetic Nephropathy, *J. Am. Dietetic Association* v. 98, n.9, p. A43, 1998.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA
Rosilene Linhares Dutra
e-mail: rdutra@qmc.ufsc.br - Fax: 3319542

34º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas 7º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica

10 a 14 de junho de 2007

Local:
Centro de Convenções - EXPOMINAS
Belo Horizonte - MG



Promoção e Realização
SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS

Detecção da incidência de enteroparasitos nas crianças carentes da cidade de Guaçuí – ES*

Detention of the incidence of enteroparasites in the devoid children of the city of Guaçuí - ES

Juliano Gomes Barreto

RESUMO - O objetivo deste estudo foi estimar a prevalência de enteroparasitoses em crianças e adolescentes moradores de Guaçuí – ES, mais precisamente da Rua Roberto Mendes, e propor a implantação de um programa de educação sanitária na região. A necessidade do estudo, bem como da implantação do referido programa, justificam-se pelo fato de haver muitas crianças carentes nesta região, expostas à precárias condições de moradia, falta de saneamento básico e alimentação inadequada, aspectos estes que, indubitavelmente, aumentam as chances de ocorrer alta incidência de verminoses, assim como a existência de verminoses múltiplas. Para tanto, foi feita a coleta de fezes das crianças e adolescentes e estas foram encaminhadas para análise laboratorial. Das 35 amostras estudadas, os parasitos mais freqüentes entre os protozoários foram *Entamoeba coli* (25,7%), *Entamoeba histolytica* (17,1%) e *Giardia lamblia* (2,9%). Já entre os helmintos, os mais freqüentes foram *Ascaris lumbricoides* (62,9%), *Trichuris trichiura* (48,6%), *Ancilostomideo sp* (5,7%), *Strongiloydes stercoralis* (8,6%) e *Enterobius vermiculares* (5,7%).

PALAVRAS-CHAVE - Enteroparasitoses; Crianças carentes; Rua Roberto Mendes.

SUMMARY - The objective of this study was estimate the prevalence of enteroparasitoses in children and living adolescents of Guaçuí - ES, more necessarily of the Street Robert Mendes, and to consider the implantation of a program of sanitary education in the region. The necessity of the study, as well as of the implantation of the related program, is justified for the fact to have many devoid children in this region, displayed the precarious conditions of housing, lack of basic sanitation and inadequate feeding, aspects these that, without quarrel, increase the possibilities to occur high incidence of worms, as well as the existence of multiple worms. For in such a way, he was made the excrement collection of 35 children and adolescents and these had been directed for laboratorial analysis. Of the 35 studied samples, the parasites most frequent between the protozoans had been *Entamoeba coli* (25,7%), *Entamoeba histolytica* (17,1%) e *Giardia lamblia* (2,9%). Already between the helminth, most frequent they had been *Ascaris lumbricoides* (62,9%), *Trichuris trichiura* (48,6%), *Ancilostomideo sp* (5,7%), *Strongiloydes stercoralis* (8,6%) and *Enterobius vermiculares* (5,7%).

KEYWORDS - Enteroparasitosis; Devoid children; Street Robert Mendes.

INTRODUÇÃO

As parasitoses intestinais ainda constituem um sério problema de Saúde Pública no Brasil ocupando lugar de destaque no cenário das doenças tropicais, constituindo assim, expressiva causa de morbidade e de mortalidade, tornando-se um importante problema de ordem sanitária e social, apresentando maior prevalência em populações de nível sócio-econômico mais baixo, que vivem em condições precárias de saneamento e, até mesmo, a ausência de imunidade a re-infecções, o parasitismo intestinal torna-se mais freqüente e relevante, inclusive pela possibilidade de redução da absorção intestinal, podendo influenciar no crescimento e desenvolvimento, resultando em altos índices de morbidade.

São necessárias ações combinadas de terapêutica, saneamento e conscientização sanitária para que se obtenha efetivo controle dessas enfermidades.

As crianças e os adolescentes são os mais acometidos, devido a estarem freqüentemente expostos a constantes condições de reinfecção, quando permanecem em ambientes favoráveis à transmissão.

Diversos estudos têm demonstrado que ações educativas e participativas da comunidade contribuem substancialmente para a redução da prevalência das enteroparasitoses. Para que essas ações sejam implementadas, é necessário que se tenha pleno conhecimento da realidade em que a comunidade está inserida.

Assim, com vistas a fornecer subsídios a um Projeto de Educação de Base, estudos epidemiológicos sobre a incidência destes parasitos em crianças e adolescentes carentes da Rua Roberto Mendes em Guaçuí, objetivam a propo-

sição e programas de prevenção e controle, bem como, a integração de medidas técnicas de controle, saneamento básico, diagnóstico, tratamento antiparasitário e a ações educativas.

Este projeto destina-se a propor um programa de educação sanitária visando à prevenção, a fim de evitar a disseminação de doenças originadas destas parasitoses.

A baixa qualidade de vida justificada pela falta de moradia adequada, alimentação básica e saneamento básico na comunidade referenciada, faz com que aumente a possibilidade da existência de uma alta incidência de verminoses, assim como a existência de verminoses múltiplas.

Com base nessa preocupação, o presente projeto buscou desenvolver um trabalho que viabilizasse a identificação dos problemas e a confirmação da real incidência que vem acometendo a referida população ao longo dos anos, ressaltando a falta de programas eficazes de controle, combate e conscientização da população quanto aos perigos e agravos dessas doenças.

A proposta deste trabalho consiste em propor a população acometida, um tratamento adequado que vise o controle das parasitoses assim como melhoria da qualidade de vida da população beneficiada; orientar a população quanto às medidas de profilaxia e combate aos parasitos e seus hospedeiros, visando uma melhoria tanto da qualidade de vida individual quanto da saúde coletiva da população; demonstrar às autoridades sanitárias a real necessidade da implantação de medidas técnicas de saneamento básico, implantação de rede de esgoto e limpeza do córrego, sendo este a principal fonte de contaminação da população; e, por fim, reduzir ou erradicar algumas enteroparasitoses decorrentes da falta de saneamento básico e educação sanitária.

Recebido em 21/07/2005

Aprovado em 27/07/2006

*Trabalho desenvolvido na Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Alegre – FAFIA / ES.

Farmacêutico Bioquímico Especialista em Análises Clínicas, Laboratório Kashima de Análises Clínicas – Guaçuí / ES. Hospital São José – S. J. do Calçado / ES.

MATERIAL E MÉTODOS

Para desenvolver este trabalho, tomou-se como amostragem a coleta de fezes de 60 crianças e adolescentes carentes, de faixa etária entre 1 a 14 anos, residentes na Rua Roberto Mendes, localizada no bairro Sagrado Coração de Jesus, em Guaçuí-ES, um bairro de classe pobre, sem infraestrutura adequada, com rede de captação de esgoto e saneamento básico deficientes.

O bairro é delimitado pelo Córrego Santa Catarina que pode ser considerado como a principal fonte de contaminação, devido ao lançamento in natura de muitos dejetos e esgoto sem o menor tratamento.

Devido às crianças estarem constantemente expostas a estas condições ambientais, estando sempre em contato direto com focos de infecção e não tendo uma educação sanitária adequada quanto à presença de certas parasitoses e outras infestações, as mesmas ficam completamente à mercê da própria sorte e das resistências imunológicas do organismo. Como não havia disponibilidade de uma alta tecnologia avançada e de grandes recursos financeiros, este trabalho utilizou como método de escolha, o método da sedimentação espontânea de Hoffmann, devido à sua boa abrangência a um grande número de Helminthos e Protozoários.

RESULTADOS

A proposta deste trabalho consistiu no atendimento de 60 crianças e adolescentes carentes, residentes próximos às margens do córrego Santa Catarina, nas proximidades da Rua Roberto Mendes. No entanto, das 60 crianças e adolescentes cadastrados, apenas 35 participaram do estudo, onde a taxa média de aceitação do projeto pela comunidade foi de 58,3%, uma média considerada abaixo do esperado devido à gratuidade dos exames e do tratamento.

Das 35 amostras 31 (88,6%) estavam positivas (Tabela I), onde o parasito mais freqüente nas 35 amostras, entre os protozoários foi *Entamoeba coli* (25,7%), *Entamoeba histolytica* (17,1%) e em seguida *Giardia lamblia* (2,9%). Entre os helmintos o mais freqüente foi *Ascaris lumbricoides* (62,9%), seguido por *Trichuris trichiura* (48,6%), *Ancilostomídeo* (5,7%), *Strongiloides stercoralis* (8,6%) e *Enterobius vermiculares* (5,7%).

TABELA I

Distribuição dos parasitas por espécie encontrados nas 35 amostras analisadas das crianças e adolescentes da Rua Roberto Mendes em Guaçuí/ES.

PARASITAS	Nº Amostras	% Amostras
<i>A. lumbricoides</i>	22	62,9%
<i>T. trichiura</i>	17	48,6%
<i>E. vermiculares</i>	2	5,7%
<i>G. lamblia</i>	1	2,9%
<i>E. histolytica</i>	6	17,1%
<i>E. coli</i>	9	25,7%
Ancilostomídeo	2	5,7%
<i>S. stercoralis</i>	3	8,6%
Negativas	4	11,4%

Na maioria dos casos, foi encontrado monoparasitismo (31,4%) e biparasitismo (31,4%), embora tenham sido detectados até quatro parasitas associados em nove crianças (Tabela II).

TABELA II

Prevalência do enteroparasitismo observado em 35 amostras de crianças e adolescentes da Rua Roberto Mendes em Guaçuí / ES.

	Negativo	Monoparasitismo	Biparasitismo	Poliparasitismo*	Total
Nº Amostras	4	11	11	9	35
% de Amostras	11,43%	31,43%	31,43%	25,71%	100,0%

* Poliparasitismo – associação de três ou mais parasitas

A associação mais observada foi entre *A. lumbricoides* e *T. trichiura* que se apresentou muito comum na região.

DISCUSSÃO

Ao final dos resultados obtidos através das pesquisas, foi possível comprovar a alarmante incidência de enteroparasitos que acometem as crianças carentes da Rua Roberto Mendes, em Guaçuí.

Mas, mesmo com a baixa adesão ao projeto, foram obtidos ótimos resultados e um apoio da população dentro do previsto, indicando assim uma sensibilização moderada da comunidade frente à necessidade do diagnóstico das parasitoses intestinais acometendo as crianças. Esta alta incidência é devida, principalmente, à água não potável, destino inadequado do lixo, falta de saneamento básico, hábito de ingerir hortaliças cruas e principalmente falta de orientação quanto aos meios de prevenção.

Neste estudo, a alta freqüência encontrada originou-se tanto de uma transmissão interpessoal entre as crianças quanto de contaminações de alimento e água, uma vez que a comunidade carece de rede de saneamento básico e abastecimento de água potável em grande número de residências. O monoparasitismo ocorreu em 31,4% das crianças estudadas, enquanto que a freqüência de poliparasitismo foi 25,7%, e a de biparasitismo foi de 31,4%. Com relação aos helmintos, o *A. lumbricoides* foi o mais prevalente, ocorrendo em 22 das 35 crianças, seguido pelo *T. trichiura* (17), estando estes associados em 14 crianças.

Estes dados coincidem com os resultados obtidos por Ferraroni *et al*1 e Tavares-Dias e Grandini *et al*4, em suas publicações de pesquisas realizadas com crianças carentes na Cidade de Manaus – AM, e em São José da Bela Vista – SP, respectivamente.

Foram detectados apenas dois casos de enterobiose através dos exames realizados, sendo tal fato esperado uma vez que não foi utilizada uma metodologia apropriada para o seu diagnóstico.

Foram encontradas larvas de *Strongiloides stercoralis* e de ovos de ancilostomídeos, sugerindo que nas áreas estudadas possivelmente está ocorrendo a circulação de parasitos que infectem o homem através de mecanismos ativos cutâneos, talvez devido ao não uso de calçados pela população e um grande contato direto com solo contaminado por larvas destes helmintos.

Após a obtenção dos resultados dos exames, estes foram encaminhados ao pediatra do Posto de Saúde que atende a Comunidade, visando o tratamento, através dos medicamentos que foram conseguidos gratuitamente junto à secretaria municipal de saúde, promovendo assim o trata-

mento mais adequado a cada parasitose. Para garantir a manutenção da saúde das crianças, foram propostas algumas palestras educativas enfocando medidas de prevenção e alguns cuidados aos pais, as crianças e adolescentes, abordando transmissão das enteroparasitoses, com intuito de reduzir ou evitar novas infecções e reinfecções.

Apesar destas atividades desenvolvidas com as comunidades, os resultados demonstram a necessidade da implementação de medidas de saneamento básico e programas contínuos, concomitantemente, visando a educação sanitária, acompanhamento rotineiro das infecções parasitárias bem como participação e verificação da eficácia do tratamento preconizado. A associação destas medidas possibilita uma melhoria da condição de vida das crianças, bem como da comunidade, o que, conseqüentemente, reduz em alguns casos o agravamento da desnutrição, melhorando o aprendizado e o desenvolvimento destas crianças.

AGRADECIMENTOS

O autor agradece ao Dr. José Luiz Menezes de Paiva, então Secretário Municipal de Saúde por disponibilizar a Agente Comunitária de Saúde, Srt^a Andressa Barros que auxiliou no cadastramento, consentização das famílias e na coleta dos dados e amostras. A FAFIA por ceder as instalações de seus laboratórios e equipamentos.

REFERÊNCIAS

- 1- FERRARONI, M.J.R.; MARINHO, H.A.; NAGAHAMA, D.; ROCHA, Y.R.; SILVA, N.B.; CASTRO, J.S. Prevalência de enteroparasitas na cidade de Manaus. *J. Pediatr.*, 67:24-28, 1991.
- 2- NEVES, David Pereira. *Parasitologia Humana*. 10. ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 2000.
- 3- REY, L. Métodos e técnicas Usuais em Parasitologia. In: REY, L. *Parasitologia*. 2. ed. São Paulo: Editora Guanabara Koogan, 1991. p. 681- 693.
- 4- TAVARES-DIAS, M.; GRANDINI, A.A. Prevalência e aspectos epidemiológicos de enteroparasitoses na população de São José da Bela Vista, São Paulo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 32:63-65, 1999.
- 5- THIENPONT, D.; ROCHETTE, F.; VANPARIJS, O.F.J. Diagnóstico das helmintoses por meio de exames coprológicos. 2. ed. Fundação Janssen Research. Beerse, Bélgica, 1986.

Endereço para correspondência:

Juliano Gomes Barreto.

Rua Roldão Souza, 228 Centro

Guaçuí-ES. Cep 29560-000.

e-mail <julianobarreto@hotmail.com>



Sociedade Brasileira de Análises Clínicas®

IFCC WORLDLAB Fortaleza - Brasil

20º Congresso Internacional de Bioquímica e Medicina Laboratorial

35º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas

8º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica

28 de setembro - 2 outubro/2008

Local:

Centro de Convenções do Ceará

Comparação dos resultados obtidos pelos métodos de contagem por campo e contagem de Addis modificada utilizados para a análise do sedimento urinário*

Comparison of the obtained results by the methods of counting by field and Addis' modified counting used for the analysis of the urinary sediment

Marco Antonio Costa¹, Gislaïne Franco de Moura Costa², Jacqueline Plewka Machado³, Juliana Lúcia Duarte⁴, Simone Kleckner Jazar⁴ & Sabrina Souza Abrantes⁴

RESUMO - O exame de urina é amplamente utilizado na clínica, auxiliando no diagnóstico das patologias envolvendo o trato urinário. É constituído por análise física, química e microscópica. Considera-se a possibilidade de dois tipos de exame do sedimento urinário, o qualitativo, onde avalia-se o número de elementos por campo, e o quantitativo, onde realiza-se a contagem dos elementos em câmara de hemocitômetro e exprimem-se os resultados por mL de urina. As duas metodologias são amplamente aceitas, entretanto, não há relatos que mostrem uma comparação entre os valores encontrados nos dois métodos, nem uma comprovação de qual destas metodologias reflete melhor a realidade clínica do paciente. Estes fatos fundamentaram o presente estudo que teve como base a realização de exames de urinas obtidas da rotina do Hospital Universitário do Oeste do Paraná. Cada urina foi submetida à análise físico-química e microscópica pelas duas metodologias. Os resultados obtidos na microscopia foram correlacionados com a tira reagente, com os prontuários dos pacientes e também permitiram uma comparação entre os métodos à procura de uma equivalência. Todos os resultados indicaram a contagem de Addis modificada como a mais confiável em revelar as alterações presentes nas amostras, assim como mais concordante com a realidade clínica do paciente.

PALAVRAS-CHAVE - Urinálise, Sedimentoscopia, Parcial de urina

SUMMARY - The urine exam is thoroughly used in the clinic, helping in the diagnosis of the pathologies involving the urinary tract. It is constituted by physical, chemistry and microscopic analysis. It is considered the possibility of two types of exam of the urinary sediment, the qualitative, where the number of elements is evaluated by field, and the quantitative, where it takes place the counting of the elements in hemocytometer camera and express the results for urine per milliliters. The two methodologies are accepted, however, there are not reports that show a correlation among the values found by the two methods, nor a confirmation of which of these methodologies better reflects the clinical reality of the patient. These facts justified the present study that had as base the accomplishment of exams of urines obtained of the routine of the University Hospital of the West of Paraná. Each urine was submitted to the physical-chemistry and microscopic analysis for the two methodologies. The results obtained in the microscopy were correlated with the dipstick, with dossier of the patients and it also allowed search of the an equivalence by comparison among the two methods. Every results indicated that the Addis modified counting was the most reliable in revealing the samples' alterations, as well as more concordant with the clinical reality of the patients.

KEYWORDS - Urinalysis, Sedimentoscopia, Urine test

INTRODUÇÃO

Grande aliado da medicina preventiva e da redução dos custos médicos, o exame parcial de urina, quando realizado adequadamente, fornece informações valiosas que são obtidas com um mínimo de desgaste para o paciente e de maneira indolor.^{1,2}

Trata-se de uma prova rotineira, conhecida como um teste de triagem de ampla utilização desde a mais remota antiguidade. Tem a sua importância evidenciada pela sua simplicidade, baixo custo, facilidade na obtenção da amostra e pela habilidade na detecção de distúrbios eventuais do organismo que possam estar afetando indiretamente a função renal e produzindo resultados anormais no exame de urina, como diabetes, hepatopatias, intoxicações, entre outras. Assim, como também, é extremamente útil na detecção de doenças renais e do sistema genitourinário, dentre as quais, deve-se destacar as glomerulonefrites, a síndrome nefrótica, a glomeruloesclerose, a pielonefrite, a insuficiência renal, a litíase, a cistite e até mesmo o câncer.^{3,4,5,6,7}

Diversas técnicas laboratoriais encontram-se envolvidas na

avaliação da urina e não obstante, novas técnicas continuarão a expandir seu potencial diagnóstico.² Em conjunto da crescente importância dada a este exame, nos últimos anos ele tem agregado avanços e inovações metodológicas a fim de aprimorar suas funções, e a inclusão de métodos automatizados na rotina laboratorial; tem contribuído significativamente, auxiliando na decisão diagnóstica rápida e precisa.^{8,9,10,13,14}

No entanto, atualmente, a urinálise manual constitui-se a prova diagnóstica que mais utiliza com este material, provavelmente devido a fatores econômicos e/ou estruturais.^{8,9,10}

A urinálise de rotina é basicamente composta pela análise física, análise química e exame microscópico. Antes da realização de qualquer teste, deve-se avaliar os aspectos que concernem a sua aceitabilidade, como condições de coleta, armazenamento e identificação.^{2,5,6}

O exame físico da urina corresponde à primeira análise a ser feita na urina. Estes resultados representam grande valor na confirmação ou explicação das análises de testes bioquímicos e microscópicos. A análise física compreende a

Recebido em 09/06/2005

Aprovado em 27/07/2006

* Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE - Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas - Laboratório de Citopatologia Clínica
¹Farmacêutico, Prof. Assistente, CCMF, Campus de Cascavel, UNIOESTE, Cascavel, Pr, (0XX45)2203156 - CEP 85819-110, e-mail: macosta@unioeste.br

² Farmacêutica, Prof. Auxiliar, CCMF, Campus de Cascavel, UNIOESTE, Cascavel, Pr

³ Farmacêutica, Prof. Auxiliar, CCMF, Campus de Cascavel, UNIOESTE, Cascavel, Pr

⁴ Acadêmicas do 5º ano do Curso de Farm, CCMF, Campus de Cascavel, UNIOESTE, Cascavel, Pr

observação da cor, aspecto, volume, odor e densidade.^{2,5,6} O exame químico permite que sejam feitas pesquisas, dosagens e determinações dos diferentes elementos presentes na urina, fornecendo valiosas informações diagnósticas a respeito de pH, proteínas, glicose, cetonas, sangue, bilirrubinas, urobilinogênio, nitrato e leucócitos.³ Este teste bioquímico geralmente é feito por meio de tiras reativas. Estas constituem uma forma eficaz, simples, rápida e econômica de pesquisa e dosagem de elementos, além de dispensarem conhecimento teórico e preparo básico de técnicas nos laboratórios.⁵

Por sua vez, o exame microscópico do sedimento urinário é sem dúvida, um dos elementos mais importantes para o diagnóstico e prognóstico das afecções do trato urinário.^{11,12} Tem a finalidade de detectar, identificar e quantificar os elementos insolúveis oriundos do sangue, rins, parte inferior do sistema urogenital e contaminação externa. Estes elementos incluem hemácias, leucócitos, cilindros, células epiteliais, bactérias, leveduras, parasitas, muco, espermatozóides, cristais e artefatos.^{2,6} Quase sempre, o encontro de elementos anormais no sedimento urinário, relaciona-se com distúrbios das vias urinárias ou reprodutivas e sua demonstração é importante para fundamentar um diagnóstico suspeito.

Classicamente, considera-se a possibilidade de dois tipos de exame do sedimento urinário, o qualitativo e o quantitativo. O exame qualitativo, conhecido como método de contagem por campo, expressa os achados em número de elementos identificados por campo microscópico, tomando-se a média de vários campos examinados.⁵

O exame quantitativo do sedimento urinário, também conhecido como "Método de Addis modificada", fornece valores mais precisos dos elementos presentes na urina, uma vez que faz uso de uma câmara de hemocitômetro, o que permite que os resultados sejam expressos por ml de urina.³

Para a realização do exame do sedimento urinário, alguns laboratórios optam pelo método de Contagem de Addis modificada, enquanto que outros utilizam a contagem por campo. Assim, as duas metodologias e seus respectivos valores de referência são amplamente aceitos, permitindo facilmente a interpretação das alterações que se fazem presentes na amostra. Porém, não há uma comparação entre os valores encontrados nos dois métodos, o que tem trazido dificuldades, principalmente, na análise da intensidade do processo. De forma análoga, também não há uma comprovação de qual dessas metodologias reflete melhor a realidade da amostra perante a realidade clínica do paciente. Assim, o objetivo deste trabalho foi estabelecer uma comparação entre as duas metodologias.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados exames de urina em amostras obtidas da rotina do Hospital Universitário do Oeste do Paraná (HUOP) no município de Cascavel, no Paraná, no período de setembro de 2003 a maio de 2004.

Cada amostra enviada ao setor de Citopatologia do hospital foi submetida às análises física e química, por meio das tiras reagentes (dipsticks)^{5,6} e microscópica, sendo que a microscopia foi realizada por ambos os métodos, contagem por campo e contagem de Addis modificada.^{3,5,6,12}

Os resultados encontrados, assim como os dados do paciente, foram devidamente registrados para posterior comparação entre os métodos microscópicos, além de uma comparação dos mesmos com a tira reagente e com a realidade clínica do paciente.

RESULTADOS

Um total de 100 amostras de urina foram submetidas aos exames com o objetivo de fazer uma comparação entre os métodos microscópicos que pudesse resultar em uma comparação de dados. Os resultados foram comparados, utilizando-se como parâmetro, os valores de referência padronizados para cada elemento urinário para os dois métodos empregados na sedimentoscopia.^{6,12} Valores fora deste padrão indicam alterações patológicas.

Para a comparação entre os valores encontrados nas duas contagens os dados foram tabulados conforme observados nas tabelas 01 e 02, as quais contêm os resultados para leucócitos, hemácias, células epiteliais e cilindros.

Para a comparação entre os valores encontrados nas duas contagens os dados foram tabulados conforme observados nas tabelas 1 e 2, as quais contêm os resultados para leucócitos, hemácias, células epiteliais e cilindros.

TABELA I

Correlação entre o número de elementos encontrados pelos métodos de Contagem por campo e Contagem de Addis Modificada.

NÚMERO DE LEUCÓCITOS ENCONTRADOS		NÚMERO DE HEMÁCIAS ENCONTRADAS		NÚMERO DE CÉLULAS EPITELIAIS ENCONTRADAS	
POR CAMPO MICROSCÓPICO	POR mL DE URINA	POR CAMPO MICROSCÓPICO	POR mL DE URINA	POR CAMPO MICROSCÓPICO	POR mL DE URINA
00	1000	00	1000	00	500
01	250 a 17500	01	1000 a 10000	01	250 a 23500
02	500 a 19750	02	1000 a 19000	02	1000 a 24000
03	1750 a 18750	03	5000 a 26000	03	250 a 16500
04	2000 a 32000	04	8000 a 30000	04	5000 a 25000
05	2000 a 36000	05	7000 a 66000	05	12000 a 42000
07	7000 a 57500	06	29000	06	23000 a 40500
08	11250 a 35500	07	25000	07	25000 a 58750
10	27000 a 71750	09	156000	08	18750 a 56000
14	7000 a 72000	10	15000 a 109000	09	17250 a 99000
16	96000	11	42000	10	40000
20	190000	12	55000	12	27000
24	138250	14	80000	14	21500
39	317000	16	128000	18	86000
40	120000	18	77000	19	96750
43	115500	20	113000		
45	148750	21	104000		
47	85000	23	96000		
70	88000	32	105000		
73	114000	78	25000		
80	87250	Mais de 100	De 725000 a 5120000		
Mais de 100	De 289000 a 1712500				

TABELA II

Correlação entre o número de Cilindros Hialinos, Granulosos e Leucocitários encontrados pelos métodos de Contagem por Campo e Contagem de Addis Modificada.

TIPOS DE CILINDROS ENCONTRADOS	NÚMERO DE CILINDROS POR CAMPO MICROSCÓPICO	NÚMERO DE CILINDROS POR mL DE URINA.
Cilindros Hialinos	0	550
	Menos que 01	110 a 1760
	01	110 a 5940
	02	4250
	04	14740
Cilindros Granulosos	Menos que 01	220 a 2200
	01	2200
	04	690
	05	16830
Cilindros Leucocitários	01	1870
	02	8580

Para enfatizar estes achados, as figura 1, 2 e 3 demonstram um comparativo entre os resultados considerados normais para leucócitos, hemácias e células epiteliais, respectivamente, pela contagem por campo e seus valores correspondentes expressos em mL de urina.

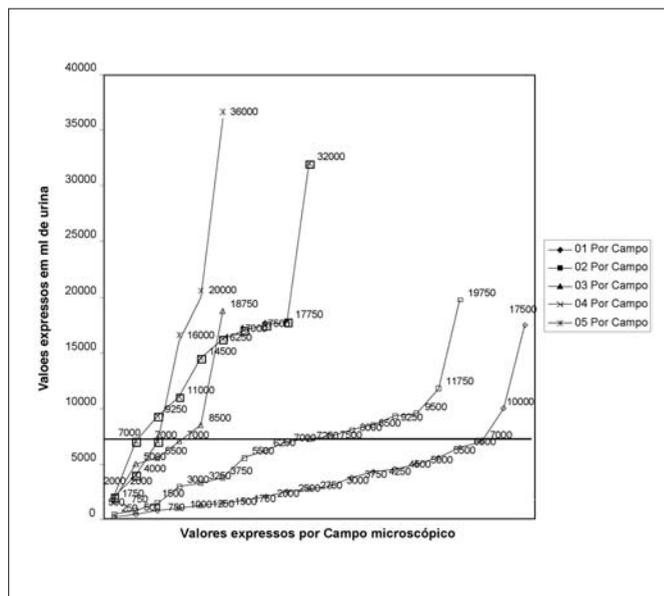


FIGURA 1 – Gráfico comparativo entre os resultados padronizados como normais (de 0 a 5) para leucócitos pela Contagem por Campo e seus valores correspondentes expressos por ml de urina. A linha traçada indica um limite a partir do qual valores superiores representam os elementos expressos por ml de urina que estão fora dos padrões de normalidade, apesar de serem considerados normais quando expressos por campo microscópico.

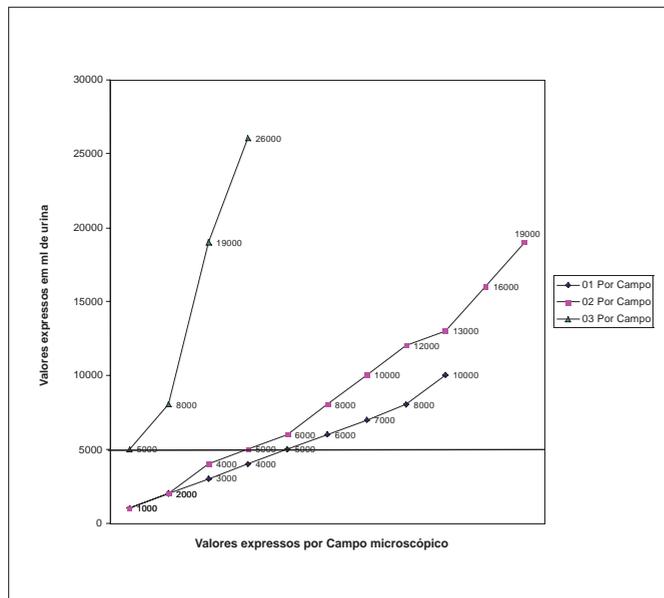


FIGURA 2 – Gráfico comparativo entre os resultados padronizados como normais (de 0 a 3) para hemácias pela Contagem por Campo e seus valores correspondentes expressos por ml de urina. A linha traçada indica um limite a partir da qual valores superiores representam os elementos expressos por ml de urina que estão fora dos padrões de normalidade, apesar de serem considerados normais quando expressos por campo microscópico.

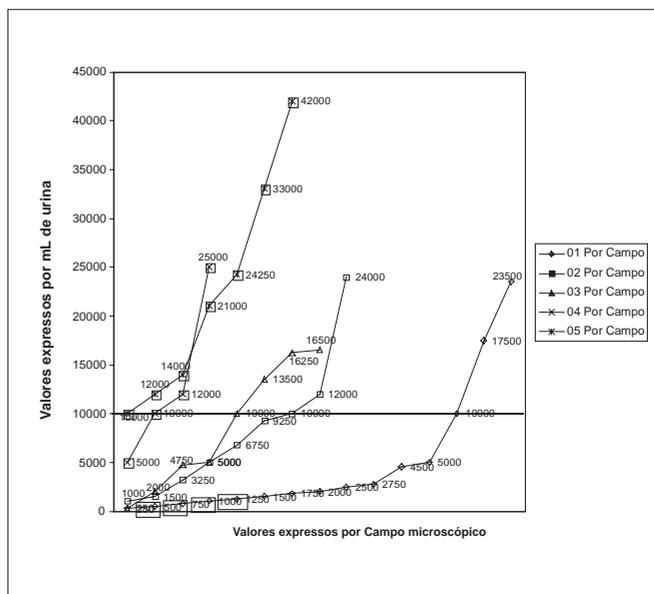


FIGURA 3 – Gráfico comparativo entre os resultados padronizados como normais (de 0 a 5) para células epiteliais pela Contagem por Campo e seus valores correspondentes expressos por ml de urina. A linha traçada indica um limite a partir da qual valores superiores representam os elementos expressos por ml de urina que estão fora dos padrões de normalidade, apesar de serem considerados normais quando expressos por campo microscópico.

Para a análise comparativa entre a contagem por campo e a contagem de Addis modificada em relação à tira reagente, 100 exames parciais de urina foram realizados. Destes, 20 (20%) não apresentaram alterações na tira reagente. As urinas que apresentaram alterações somaram 80%, sendo que foram encontrados 39 casos de proteinúria (39%), 35 casos de hemoglobinúria (35%), e 6 casos de nitrito(6%)(figura 4).

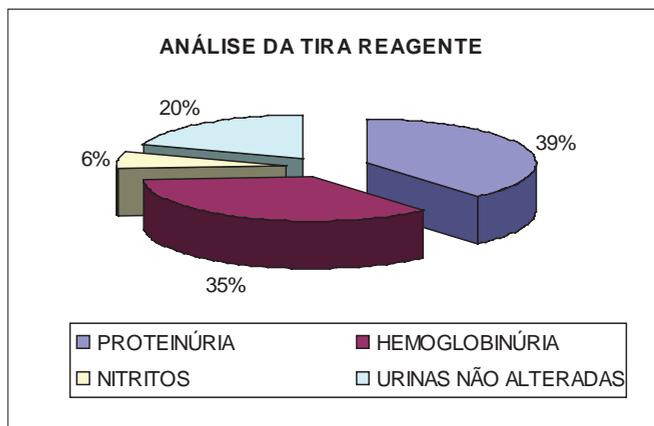


Figura 4 : Principais alterações observadas com o uso de tira reagente

A partir destes resultados, fez-se um comparativo analisando cada urina pelos dois métodos de contagem sedimentoscópica para verificar se as duas contagens refletiam ou não as alterações. Verificou-se que para a proteinúria, de um total de 39 alterações, 38 foram evidenciadas pelos dois métodos e somente em 1 caso o reflexo desta alteração foi detectado pela contagem em câmara e não por campo. Quanto à hemoglobinúria, das 35 alterações, 28 foram demonstrados pelos dois métodos enquanto que 7 delas não foram detectadas pela contagem por campo. Já em relação ao nitrito, ambas as refletiram a positividade. (figura 5).

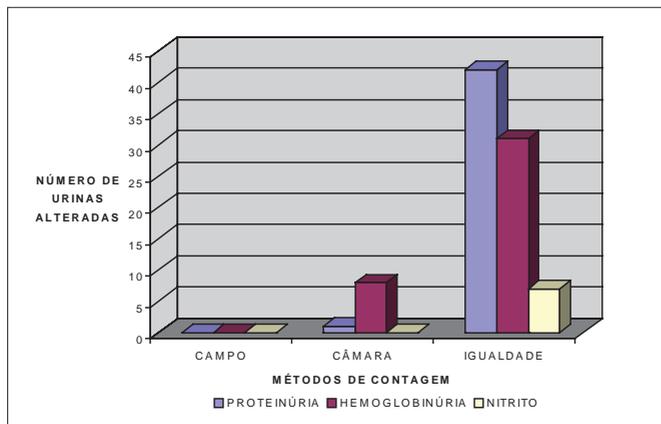


Figura 5: Comparação da detecção de alterações da fita pelos diferentes métodos de contagem.

Para estabelecer uma comparação entre os exames microscópicos com a clínica dos pacientes, 41 exames de urina foram realizados seguindo-se ambas as metodologias, e os resultados das urinas foram comparados com os prontuários dos mesmos. Destes, 26 casos (63,42%) não apresentaram qualquer diferença entre os métodos, ou seja, ambos revelaram ou não a presença das patologias através do número de hemácias e/ou leucócitos detectados nas contagens. Porém em 15 casos (36,58%), a contagem por câmara se mostrou superior em detectar alterações não visualizadas pela contagem por campo.

DISCUSSÃO

Nos últimos anos temos visto o incremento das análises automatizadas em Laboratórios de Análises Clínicas em todos os setores, incluindo a urinálise. No entanto, apesar destes avanços tecnológicos, o que se observa é que a maioria dos laboratórios de nosso país, ainda realizam estes exames manualmente.

COSTAVAL *et al.* (2003)¹⁵ demonstram não haver necessidade de realização de análise sedimentoscópica quando o resultado da análise química, através da tira reagente é normal, porém, a realização do exame do sedimento urinário ainda acontece para todas as urinas da maioria dos laboratórios, os quais a fazem ou pelo método quantitativo ou pela contagem por campo. Entretanto, algumas dificuldades têm sido observadas principalmente na análise da intensidade do processo, pois os clínicos podem recebê-los pelos dois métodos, o que tem dificultado esta padronização. Além disso, alguns profissionais demonstram a preferência pelos resultados emitidos por mL de urina¹⁶.

Assim, nossos resultados estabeleceram uma comparação entre os valores encontrados na contagem por campo e os valores correspondentes na contagem em câmara.

Considerando-se os valores de referência padronizados para cada elemento urinário, diferenças marcantes entre as contagens podem ser observadas. Como demonstrado na tabela 1 e na figura 1, valores da contagem de leucócitos que indicam um quadro de normalidade quando realizado por campo (0 a 5 por campo) não apresentaram o mesmo significado clínico na contagem em câmara, visto que os valores variam desde normais (até 7000 por mL) até alterados. O mesmo padrão é encontrado quando comparamos os resultados da contagem de hemácias e células epiteliais (tabela 1, figuras 2 e 3).

Em relação aos valores considerados anormais para as duas

metodologias, podemos observar também grandes variações, principalmente no que diz respeito a intensidade do processo. Os resultados das tabelas 1 e 2 demonstram que a contagem por campo falha em demonstrar a verdadeira intensidade, visto que a contagem em câmara revela valores muito diferentes para a mesma contagem por campo.

Devemos considerar também, que na contagem dos cilindros, como demonstrado na tabela 2, em uma única urina, os cilindros foram encontrados quando a contagem foi realizada em câmara (resultado considerado normal) o que não aconteceu quando observado por campo.

Para ressaltar esses achados, vale relembrar a diferença na metodologia das duas contagens, onde, para realizar a sedimentoscopia pela contagem por campo partimos de 0,5 mL do sedimento e para realizar em câmara partimos de 1 mL, fato este que nos levaria a crer que a contagem por campo mostraria maior reprodutibilidade quanto às alterações e suas intensidades, o que interessantemente não ocorreu.

Vários fatores podem contribuir para o achado. Na contagem em câmara observa-se um maior volume de urina, devido a sua profundidade¹², sendo que o retículo da câmara facilita a observação de detalhes e favorece a visualização pelo observador. Na contagem por campo há o prejuízo de se contar campos aleatórios, os quais nem sempre apresentam a realidade da amostra devido à dificuldade de se obter campos homoganeamente distribuídos, o que não acontece em câmara, pois o retículo delimita a área a ser contada. E ainda temos que considerar a subjetividade do observador.

De acordo com os resultados encontrados durante a comparação entre as metodologias estudadas com a tira reagente, observamos que a contagem de Addis aparentemente permite confirmar com maior sensibilidade os elementos químicos anormais detectados pela tira na urina, principalmente o aparecimento de hemoglobina advinda da destruição das hemácias.

Quanto aos dados encontrados durante o estabelecimento de uma comparação entre os exames, com a clínica do paciente, observamos novamente que a contagem por câmara obteve uma melhor performance em revelar as alterações presentes na amostra.

Nossos resultados são comparativos com um número limitado de amostras, mesmo assim nos levam a crer que urinas com alterações podem não ser detectadas ou ainda, podem não revelar a verdadeira intensidade quando a sedimentoscopia for realizada pela contagem por campo. Assim, outros trabalhos com um número maior de amostras e com uma correlação estatística devem ser realizados para comprovar este fato.

REFERÊNCIAS

1. AMIN, A.B.; MAGALHÃES, A.J. Interpretação prática do exame de urina. Revista H.U., Juiz de Fora, v.12, n.2, p. 43 -53, mai/ago.1985.
2. HENRY, J.B. Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. 19.ed. São Paulo: Manole, 1999.
3. CARRAZZA, F.R.; ANDRIOLO, A. Diagnóstico Laboratorial em pediatria. São Paulo: Sarvier, 2000.
4. HUNGARO, C.M.; AYROSA, P.S.; SANCHES, S.F. Workshop de informática aplicada à saúde. Avaliação do uso de programa tutor no ensino da urinálise. São Paulo, 2001. disponível em: <www.cbcomp.univavli.br/anais/pdf/2001/wsp 011.pdf>. Acesso em: 8 mai.2004.
5. LIMA, A.O.; SOARES, J.B.; GRECO, J.B.; GALIZZI, J.; CANÇADO, J.R. Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
6. STRASINGER, S.K. Uroanálise & Fluidos Biológicos. 3.ed. São Paulo: Premi-

- er, 1998.
7. COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. Patologia Estrutural e funcional. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 1996.
 8. HANNEMANN-POHL, K.; KAMPF, S.C. Automation of urine sediment examination: a comparison of the sysmex UF-100 automated flow routine manual diagnosis (microscopy, test strips, and bacterial culture). Clin chem lab Med. v.37, n.7, p. 753 - 64, 1999.
 9. REGENITER, A.; HAENNI, V.; RISCH, L.; KOCHLI, H.P.; COLOMBO, J.P.; FREI, R.; HUBER, A.R. Urine analysis performed by flow cytometry: reference range determination and comparison to morphological findings, dipsticks chemistry and bacterial culture results - A multicenter study. Clinical Nephrology. v. 55, n.5, p. 384 - 392, 2001.
 10. DIMECH, W.; RONEY, K. Evaluation of an automated urinalysis system for testing urine chemistry, microscopy and culture. Pathology. v.34, p. 170 - 177, 2002.
 11. LENZ, L.L. Infecção Urinária. 130.ed. São Paulo: Fundo Editorial BYK, 1994.
 12. VALLADA, E.P. Manual de exames de urina. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1993.
 13. KISHIDA, N.F.M.; MARQUES, E.R.; NEVES, J; VOLANSKI, W. Modernização em busca da otimização dos serviços em uroanálise. Roche in News, São Paulo, v.57, n.2, p. 5-9, abr./mai.2003.
 14. MACHADO, M.H.T.; GONÇALVES, E.D.; LARGURA, M.A.; GONÇALVES, A.; ANDRADE, M.P.; LARGURA, A. Automação do exame de urina: comparação do Urisys 2400 com a rotina manual (Microscopia do sedimento urinário). Revista Brasileira de Análises Clínicas. Rio de Janeiro, v.35, n.4, p. 165-167, 2003.
 15. COSTAVAL, J.A.; MASSOTE, A.P.; CERQUEIRA C.M.M.; COSTAVAL A.P.; AULER A.; MARTINS G.J. Qual o valor da sedimentoscopia em urinas com características físico-químicas normais? J. Brás. Patol. Med. Lab. v.37, n.4, Rio de Janeiro, 2001.
 16. BASTOS, M.G. Propedêutica Localizatória na Microhematúrias. Medicina On Line - Revista virtual de medicina. v.2, n.7, Ano II. Jul/Ago/Set., 1999.

Endereço para correspondência:

Marco Antonio Costa

Rua Manuel Ribas, 2357/801 - Centro

Cep 85801-230 - Cascavel-PR

Tel.: 45 9133-2024

e-mail: macosta@unioste.br



Sociedade Brasileira de Análises Clínicas[®]

IFCC WORLDLAB
Fortaleza - Brasil

20º Congresso Internacional de Bioquímica e Medicina Laboratorial

35º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas

8º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica

28 de setembro - 2 outubro/2008

Local:

Centro de Convenções do Ceará

Avaliação dos níveis das hemoglobinas A2 e Fetal dosadas por HPLC em estudantes hígidos da Universidade Católica de Goiás.

Evaluation of Fetal and A2 hemoglobin by HPLC in students at Catholic University of Goias.

Paulo Roberto de Melo-Reis¹, José Alexandre Felizola Diniz-Filho², Karlla Greick Batista Dias-Penna³, Mauro Meira de Mesquita⁴, Sérgio Henrique Nascente Costa⁵, Frank de Souza Castro⁶, Yves Mauro Fernandes Ternes⁷, Cíntia do Couto Mascarenhas⁸ & Lee Chen Chen⁹

RESUMO - As talassemias são distúrbios hereditários da hemoglobina e estão relacionadas ao processo de miscigenação e da dinâmica dos genes em cada população. Existem dois grupos de talassemias, as do tipo alfa e as do tipo beta. A forma de prevenção é o diagnóstico precoce, conscientização e acompanhamento clínico do afetado. Dentre os testes utilizados para o diagnóstico das beta talassemias estão a dosagem de hemoglobinas HbA₂ e fetal. Neste trabalho realizamos uma avaliação da variação dos níveis das hemoglobinas A₂ e F, em 214 pacientes hígidos, estudantes da Universidade Católica de Goiás. A dosagem das hemoglobinas foi realizada pela metodologia da cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Os resultados mostraram que 12,6% e 5,1% dos pacientes, apresentaram valores de HbA₂ e HbF, respectivamente, acima do recomendado pela metodologia. Contudo, observamos que os valores de referência atualmente utilizados para a Hb A₂ estão dentro de limites bastante estreitos. Concluímos com esse trabalho que se faz necessário uma revisão e conseqüentemente ampliação dos valores de referência para a Hb A₂, para a metodologia da HPLC, visando uma melhor aplicação no diagnóstico das beta talassemias.

PALAVRAS-CHAVE - Talassemia beta, hemoglobina A₂, hemoglobina fetal, diagnóstico laboratorial, HPLC.

SUMMARY - *Thalassemias are hemoglobin hereditary disturbances related to the racial mixing and gene dynamics in each population. There are two groups of thalassemias, alfa and beta. The prevention is the precocious diagnostic, education and clinical observance of the affected individuals. Among the used tests for beta thalassemias are the measurement of HbA₂ and fetal hemoglobins. In this study we evaluate the variation levels of hemoglobins A₂ and F in 214 healthy patients that are also students of the Catholic University of Goias. The hemoglobin measurement was carried out by high performance liquid chromatography (HPLC) methodology. The results show that 12,6% and 5,1% of the patients presented values of HbA₂ and HbF above the limits of the methodology. However, we observed that the reference values used nowadays for HbA₂ fraction are within very narrow limits. We conclude which it is necessary a revision and consequently a change toward an amplification of these adopted reference values for HPLC methodology aiming a better use in the beta thalassemias diagnostic*

KEYWORDS - *beta thalassemia, hemoglobin A₂, fetal hemoglobin, laboratory diagnostics, HPLC.*

INTRODUÇÃO

Os genes situados no braço curto do cromossomo 11 e 16 são responsáveis pela síntese das globinas do tipo beta e alfa, respectivamente. As combinações entre as cadeias das globinas (alfa e beta) e destas com os grupos heme formam as diferentes hemoglobinas humanas, denominadas por hemoglobina A ($\alpha_2\beta_2$), hemoglobina A₂ ($\alpha_2\delta_2$) e hemoglobina fetal ($\alpha_2\gamma_2$)¹⁰.

A síntese das cadeias globínicas alfa e beta exige um rigoroso e preciso controle gênico, resultando em um equilíbrio de produção de cada uma das cadeias, de modo que as quantidades produzidas são equivalentes para formar exatamente os pares que compõem o tetrâmero globínico da hemoglobina. Entretanto podem ocorrer alterações tanto na síntese estrutural quanto na produção quantitativa das globinas, resultando nas hemoglobinas anormais, mais particularmente em hemoglobinopatias ou em talassemias, respectivamente⁸.

Tanto as hemoglobinopatias quanto as talassemias são dis-

túrbios hereditários da hemoglobina^{1,13} e que se apresentam como sendo as alterações genéticas mais freqüentes nas populações humanas^{3,8,10}. A prevalência é muito variada, dependendo do grupo étnico formador de cada população. Além disso, as migrações no mundo moderno estão muito facilitadas e as combinações gênicas para as anemias hereditárias ocorrem de forma aleatória, propiciando uma grande heterogeneidade genética^{2,5,8,11}.

Alguns exames laboratoriais, como a quantificação das Hemoglobinas A₂ e fetal, a análise dos índices hematimétricos, o estudo da morfologia eritrocitária e o teste de resistência globular osmótica dos eritrócitos à salina 0,36% associados a história clínica e familiar do paciente são procedimentos para o diagnóstico da beta talassemia^{6,7,12}. Entretanto, valores hematimétricos limítrofes e hemoglobina A₂ normais não são excludentes para a beta talassemia^{4,8}.

Portanto, o objetivo desse trabalho foi o de avaliar a variação das hemoglobinas A₂ e fetal em pessoas hígidas dosadas pela metodologia da cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

Recebido em 26/04/2005

Aprovado em 20/09/2006

Trabalho realizado no Laboratório de Estudo e Pesquisa de Anemias Hereditárias – Prof. Dr. Paulo Cesar Naoum – LEPAH - Departamento de Biomedicina - Universidade Católica de Goiás.

¹Doutorando em Biologia pelo Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Goiás (UFG) e professor do Departamento de Biomedicina da Universidade Católica de Goiás (UCG); ²Professor e pesquisador do Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Geral (UFG) e Professor visitante, UCG; ³Doutoranda em Biologia pelo Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Geral, (UFG) e professora do Departamento de Biomedicina UCG; ⁴Biomédico coordenador do Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Biomedicina-UCG; ⁵Professor do Departamento de Biomedicina-UCG; ⁶Professor e pesquisador associado ao Departamento de Biomedicina-UCG; ^{7,8}Alunos do programa de iniciação científica – Pró-Reitoria de Pesquisa – UCG; ⁹Professora e pesquisadora do Laboratório de Radiobiologia e mutagênese, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Geral, (UFG).

MATERIAL DE MÉTODOS

Foram analisadas 214 amostras de sangue, obtidas por punção venosa, utilizando solução comercial de anticoagulante EDTA (10 g/dl), 1 gota para cada 5 ml de sangue, após consentimento livre e esclarecido. As amostras estudadas foram de estudantes saudáveis da Universidade Católica de Goiás, Campus de Goiânia, provenientes de diferentes regiões do estado de Goiás. Todos os participantes apresentavam o eritrograma dentro dos valores limites da normalidade. Os eritrogramas foram realizados no aparelho ABXPentra® 60.

Além do eritrograma foram realizados outros testes de auxílio diagnóstico: teste de resistência osmótica à salina 0,36% 12; eletroforese alcalina de hemoglobina cujo hemolisado foi preparado com solução de saponina à 1% 9 e a quantificação das hemoglobinas A2 e F foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) de troca iônica utilizando o Sistema Variant (Bio-Rad®) pelo programa b Short Thal. Todas as metodologias empregadas foram realizadas no LEPAH – Laboratório de Estudo e Pesquisa de Anemia Hereditária – Prof. Dr. Paulo Cesar Naoum - do Departamento de Biomedicina da Universidade Católica de Goiás, no período de agosto a dezembro de 2004.

Estatísticas descritivas (média, desvio-padrão, coeficiente de variação, erro padrão) para as variáveis analisadas foram calculadas para o total dos dados e para os dados agrupados em 4 classes de Hb A2 (estabelecidos por um intervalo constante de 0,5, com mínimos e máximo entre 2,0 e 4,0) e de Hb F, também com intervalos de 0,5 e mínimos e máximos de 0,1 e 2,1. Essas divisões em 4 classes dentro do intervalo normal para a Hb A2 definido por Naoum&Naoum (2004) objetivaram avaliar a distribuição das amostras e verificar possíveis variações de normalidades das demais variáveis analisadas (Hb A, Hb F, VCM e RDW) dentro do intervalo de normalidade em relação aos novos valores de referência.

RESULTADOS

As 214 amostras selecionadas de alunos hígidos da Universidade Católica de Goiás que apresentaram o eritrograma normal foram submetidas ao teste de resistência osmótica à salina 0,36%. Todos os resultados foram negativos para esta metodologia, em seguida, as amostras foram analisadas por eletroforese alcalina de hemoglobina apresentando perfis compatíveis com genótipo AA. As dosagens das hemoglobinas A, A2 e fetal realizadas por HPLC, apresentaram uma grande variedade de resultados, sendo que os valores médios dos resultados obtidos estão representados nas tabelas 1 e 2. Os valores de todas as variáveis foram estabelecidos de acordo com os parâmetros de normalidade para a Hb A2. Ressalta-se que a maioria dos valores encontrados, está no intervalo de 2,5 a 3,5 (93,9%) de acordo com os parâmetros de normalidade, enquanto que para o Hb F o intervalo foi de 0,1 a 1,1 (92,8%).

TABELA I

Valores de hemoglobina a² e outros parâmetros hematológicos de alunos hígidos da ucg

Grupos	Intervalos para Hb A2	Nº de amostras constata das	%	Média Hb A	Média Hb A2	Média Hb F	VCM médio	RDW médio
1	2,0 – 2,49	5	1,4	97,1	2,3	0,0	89,6	10,7
2	2,5 – 2,99	91	42,5	96,9	2,8	0,3	90,7	11,1
3	3,0 – 3,49	110	51,4	95,5	3,1	0,5	89,1	10,9
4	3,5 – 4,0	8	3,8	96,4	3,6	0,2	89,7	10,6
	Médias	–	–	96,2	3,0	0,4	89,8	11,0
	DP	–	–	0,55	0,02	0,35	4,81	0,38
	CV	–	–	0,57	0,67	87,5	5,36	3,45
	EP	–	–	0,04	0,001	0,02	0,33	0,03
	Total	214	100,0	–	–	–	–	–

DP – Desvio padrão CV – Coeficiente de variação EP – Erro padrão

TABELA II

Valores da hemoglobina fetal e outros parâmetros hematológicos de alunos hígidos da ucg

Grupos	Intervalos para Hb F	Nº de amostras constata das	%	Média Hb A	Média Hb A2	Média Hb F	VCM médio	RDW médio
1	0,1 – 0,59	23	20,7	96,7	2,9	0,4	88,6	10,8
2	0,6 – 1,09	80	72,1	96,3	3,0	0,6	89,3	11,0
3	1,1 – 1,59	5	4,5	95,9	3,1	1,1	90,1	10,7
4	1,6 – 2,1	3	2,7	95,3	3,1	1,6	91,2	10,3
	Médias	–	–	96,3	3,0	0,7	89,4	10,9
	DP	–	–	0,55	0,02	0,09	4,81	0,38
	CV	–	–	0,57	0,67	12,9	5,38	3,48
	EP	–	–	0,05	0,002	0,008	0,46	0,04
	Total	111	100,0	–	–	–	–	–

DP – Desvio padrão CV – Coeficiente de variação EP – Erro padrão

O valor crítico adotado para as hemoglobinas Fetal e A2 foi, respectivamente, de 1,0 e 3,25%, de acordo com o limites superiores de referência recomendados pelo fabricante para a metodologia HPLC (Instruction Manual – Bio-Rad – Variant TM, b – Thalassemia Short Program).

Para a variável Hb A2, assumindo que há diferenças estatísticas ao acaso entre a população estudada e a geral de referência utilizada para estabelecer os limites pela metodologia HPLC, seria de se esperar que cerca de 11 (5,1%) indivíduos fossem, ao acaso, maiores do que o valor crítico de 3,25 (ou metade desse número, para um teste unicaudal de 5%, ou seja, 0,05 x 214 @ 11). Entretanto, em nosso trabalho, 27 indivíduos (12,6%) apresentaram valores maiores do que o limite superior de referência sugerido pelo fabricante. Esse número foi de duas vezes maior do que o esperado por um erro ao acaso das populações analisadas.

Para a variável Hb F, assumindo que há diferenças estatísticas ao acaso entre a população estudada e a geral de referência utilizada para estabelecer os limites de normalidade pela metodologia HPLC, seria de se esperar que cerca de 6 indivíduos fossem ao acaso maiores do que o valor crítico de 1,0% e foram encontrados 8 indivíduos. Utilizando-se o teste não paramétrico (teste do sinal), não foi demonstrada uma diferença significativa entre esses valores (a = 0,05).

DISCUSSÃO

A evolução ocorrida nas metodologias laboratoriais para a quantificação das frações hemoglobínicas tem sido um importante instrumento no diagnóstico dos distúrbios das hemoglobinas, principalmente os relacionados com as hemoglobinas A2 e fetal. A hemoglobina A2 aumentada é um parâmetro significativo para o diagnóstico da beta talassemia menor. Já a hemoglobina fetal aumentada é encontrada na persistência hereditária de hemoglobina fetal, nas hemoglobinopatias S, C e interações entre variadas hemoglobinopatias e talassemias¹¹.

Das 214 amostras de pessoas hígidas constata das (tabela 2), 111 apresentaram valores maiores ou iguais a 0,1% para a hemoglobina fetal. Os valores variaram de 0,2 a 1,7 %. Sendo que em 103 amostras os valores percentuais obtidos foram menores ou iguais a 1,0 %, os quais estão dentro do intervalo recomendado para os dois métodos (HPLC e Betke). Entretanto, 8 pacientes apresentaram valores de hemoglobina fetal acima de 1,0%, representando, cerca de 7,2% das amostras analisadas. O VCM destes pacientes variou de 86 a 92, com média de 90,8 fl. O maior valor encontrado para Hb F foi de 1,7% e a média desse grupo foi de 1,3% (dados não apresentados).

Os valores para hemoglobina A2 (tabela 1), variaram de

2,4 a 3,8% (dados não apresentados). A média encontrada foi de 3,0 %, nas 214 amostras. Este valor está exatamente coincidente com a média dos valores recomendados por Naoum&Naoum (2004) e diverge da média recomendada pelo fabricante (2,5%) do equipamento da HPLC. Entretanto, 27 pacientes com VCM variando entre 88,0 a 93,0 e média de 89,2 fl apresentaram valores maiores do que o limite superior recomendado pelo fabricante (3,25%) do equipamento de HPLC. A média da hemoglobina A2 para esses pacientes foi de 3,4 % e o maior valor encontrado foi de 3,8%. De fato, constatamos que o valor obtido é de aproximadamente duas vezes e meia maior do que o esperado. Esses valores poderiam ser atribuídos não a um deslocamento dos valores referenciais, mas sim a um excesso de pacientes com valores normalmente altos para as HbA2. Se esse fosse o caso as distribuições estatísticas dessas variáveis seriam assimétricas à direita. Entretanto, as variáveis para HbA2 e HbF apresentam distribuição normal. Assim, justifica-se a ampliação dos valores referenciais para a HbA2 para acomodar esses desvios.

O valor de referência recomendado pelo fabricante é de 1,75 a 3,25 % e menor que 1,0 %, respectivamente para as hemoglobinas A2 e F, utilizando o método de dosagem por cromatografia de alta performance (HPLC) (Instruction Manual – Bio-Rad – Variant TM, b – Thalassemia Short Program). Entretanto, constatamos que os valores de HbA2 encontrados no presente trabalho, estão situados de amplitude de 2,0 a 4,0%. Portanto, estão em concordância com os valores de referência sugeridos por Naoum&Naoum (2004) em pessoas hípidas. Já para os valores de referência para HbF os diversos métodos utilizados, recomendam valores de até 1,0%, (método por eluição; teste de desnaturação alcalina⁸, e pelo fabricante). Os valores encontrados por nós para HbF estão em concordância com esses diversos métodos.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos por este trabalho evidenciam a necessidade de ampliação dos valores referenciais para a hemoglobina A2 pela metodologia da HPLC. Os novos valores propostos por Naoum&Naoum (2004) são plenamente satisfatórios, uma vez que é de primordial importância levar em consideração a heterogeneidade genética da população brasileira, antes da interpretação dos resultados obtidos pela metodologia HPLC. No entanto, os resultados obtidos por HPLC para hemoglobina fetal mostram compatibilidade com os limites recomendados tanto por Naoum&Naoum (2004) como pelo fabricante. Apesar do aumento exclusivo da Hb F para 8 pacientes, esse grupo não pode ser enquadrado como sendo portadores de persistência hereditária de hemoglobina fetal 8, sendo que toda a hematimetria apresentou-se dentro dos limites de normalidade.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Prof. Dr. Nelson Jorge da Silva Junior, Coordenador do Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde-UCG, pelas orientações dispensadas a esse trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Acedo, M. J., Costa, V. A., Polimeno, N. C., *et al.* Screening program for hemoglobinopathies based on blood donors from Bragança Paulista, São Paulo, Brazil. *Cad. Saúde Pública*, vol.18, no.6, p.1799-1802, Nov./Dec. 2002.
2. Comprí, M. B., Polimeno, N. C., Stella, M. B. *et al.* Public health programs for hereditary hemoglobinopathies in high school students in Brazil. *Rev. Saúde Pública*, vol.30, no.2, p.187-195, Apr. 1996.
3. Gasperini D, Cao A, Paderi L, Barella S, Paglietti E, Perseu L, Loi D, Galanello R. Normal individuals with high Hb A2 levels. *Br J Haematol.* vol.84, no.1, p.166-168, May. 1993.
4. Hernández, J. A. *et al.* Hematología e inmigración. Impacto de la inmigración africana subsahariana en la práctica hematológica. *Haematologica*, Barcelona, vol. 87, no.1, p. 373-7, 2002.
5. Lisot, C. L. A. & Silla, L. M. R. Screening for hemoglobinopathies in blood donors from Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil: prevalence in an Italian colony. *Cad. Saúde Pública*, vol.20, no.6, p.1595-1601, Nov./Dec. 2004.
6. Lukens, J. N. & Lee, G. R. As Hemoglobinas Anormais: Princípios Gerais. In: Lee, G.R. *et al.* Wintrobe: Hematologia Clínica, São Paulo, Manole, Cap. 36, p. 1120, 1998.
7. Naoum, P. C. Hemoglobinopatias e Talassemias. São Paulo, Sarvier Ed. Livros Médicos, p. 171, 1997.
8. Naoum, P. C. Eletroforese. Técnicas e Diagnósticos. São Paulo, Ed. Santos, 1999.
9. Naoum, P. C. & Naoum, F. A. Doença das Células Falciformes. São Paulo, Sarvier, 2004.
10. Reis, P. R. M. Avaliação da prevalência de Hemoglobinopatias e talassemias em Goiás. Métodos de Identificação Laboratorial e distribuição geográfica. Goiânia, 2004. Tese de Mestrado – Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde, Universidade Católica de Goiás, 2004.
11. Silvestroni, E. & Bianco, I. Screening for microcytemia in Italy: analysis of data collected in the past 30 years. *Am. J. Human Genet.* vol. 27, p.198, 1975.
12. Orlando, G. M., Naoum, P. C., Siqueira, F. A. M. *et al.* Laboratory diagnosis of Hemoglobinopathies in different population groups. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, vol.22, no.2, p.111-121, May/Aug. 2000.
13. Weatherall, D. J. & Clegg, J. B. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bulletin World Health Organiz.* vol. 79, no. 8, p. 704-12, 2001.

Endereço para correspondência:

Paulo Roberto de Melo Reis

Universidade Católica de Goiás - Departamento de Biomedicina - (LEPAH-LAS-CBB) – Área IV – Bloco H – Sala 209 - Av. Universitária 1069 –

Setor Universitário. CEP 74605-010 – Goiânia-Go.

Fone: (62) 3946-1195

Endereço eletrônico: pauloroberto@ucg.br

IFCC WORLDLAB

Fortaleza - Brasil

20º Congresso Internacional de Bioquímica e Medicina Laboratorial

35º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas

8º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica

28 de setembro - 2 outubro/2008

Local:

Centro de Convenções do Ceará

Importância da detecção de anticorpos anti-HBc na prevenção da transmissão do vírus da hepatite B (VHB) em bancos de sangue*

Importance of anti-HBC antibodies determination in blood transfusion centers to prevent the post-transfusional hepatitis B virus (HBV)

Miriam Maria Caetano¹ & Sandra Trevisan Beck²

RESUMO - Estima-se que a prevalência global do vírus da hepatite B (VHB) seja de aproximadamente 350 milhões de portadores crônicos. No Brasil esta prevalência é de 8%, respeitando-se variações regionais. Um dos maiores riscos para transmissão desta infecção são transfusões sangüínea e seus derivados. Para prevenção da Hepatite B transfusional, são pesquisados os marcadores HBsAg, o anticorpo Anti-HBc, e alanina amino transferase (ALT), os quais demonstram a presença de diferentes perfis sorológicos entre os doadores de sangue. Foram analisados registros das pesquisas sorológicas realizadas para a triagem de doadores de sangue do banco de sangue da cidade de Santiago-RS, Brasil, no ano de 2004. Foi estimada uma prevalência de 1,9% para a infecção pelo VHB, com 1,59% dos indivíduos reagentes apenas para o marcador anti-HBc. A presença deste perfil sorológico foi discutido, levando em conta a possibilidade de não detecção de baixos níveis de HBsAg ou presença de cepas mutantes. Frente a esta possibilidade ressalta-se a importância da manutenção da determinação do marcador anti-HBc na triagem sorológica de doadores de sangue.

PALAVRAS-CHAVE - Hepatite B, HBsAg, Anti-HBc, transfusão

SUMMARY - The global prevalence of hepatitis B virus (HBV) is estimated to be 350 million of chronic carriers. In Brazil this prevalence is about eight percent (8%), with regional variations. One of the greatest risks for the transmission of this infection is blood transfusions and blood derivatives. To prevent the post-transfusion hepatitis B, the markers HBsAg, the antibody Anti-HBc, and the transaminase ALT are determined, and show the presence of different serological profiles among the blood donors. Data from the blood transfusion center in Santiago/RS, Brazil, was analyzed in the year of 2004. The prevalence estimated was 1.9 % for HBV infection, with 1.59 % of these individuals reagents only to the anti-HBc. The existence of this serological profile has been discussed considering the possibility of undetectable low levels of HBsAg or the presence of mutant strains. In front of this possibility it is important to continue determining the anti-HBc marker in the serological blood donor screening.

KEYWORDS - hepatitis B, HBsAg, Anti-HBc, transfusion

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a medicina transfusional tem evoluído bastante, graças ao aprimoramento dos testes de triagem realizados nos bancos de sangue. Com isso, a prevalência de doenças infecciosas pós-transfusionais têm diminuído consideravelmente, embora o risco continue existindo, ocorrem em aproximadamente uma a cada 63.000 unidades transfundidas⁽⁹⁾.

O controle rigoroso do sangue e derivados é um dos responsáveis pela prevenção e controle da transmissão do vírus da hepatite B (VHB). Para isto, são realizados os testes sorológicos, para detecção do antígeno de superfície (HBsAg) e do anticorpo contra proteínas do núcleo (anti-HBc). A realização de mais de um marcador é de suma importância, permitindo diminuir o risco de não detecção dos marcadores durante a infecção (janela imunológica), uma vez que cada um deles poderá ser detectado no soro em fases diferentes da doença.

O período de incubação do VHB varia de 2 a 6 meses. O HBsAg poderá ser detectado entre um e cinco meses após o contato com o vírus, permanecendo por 30 a 180 dias. Além de o HBsAg ser o primeiro marcador a ser detectado no curso da infecção pelo VHB, este poderá permanecer durante todo o período da infecção nos portadores crônicos. Antes mesmo do desaparecimento deste antígeno, aparece o anticorpo anti-HBc. Por ser o primeiro anticorpo presente, e algumas vezes o único marcador detectado du-

rante a evolução da infecção, o anti-HBc poderá indicar tanto infecção aguda pelo VHB (anti-HBc IgM) como identificar indivíduos que entraram em contato com o vírus (anti-HBc-IgG), pois este marcador usualmente persiste após a eliminação do vírus⁽⁴⁾. Dificuldades na interpretação deste marcador aparecem quando o anti-HBc é encontrado sem correspondente reatividade para HBsAg ou anti-HBs. Geralmente, o HBsAg não é encontrado ao mesmo tempo que seu anticorpo anti-HBs. O aparecimento do anti-HBs é bastante variado, de 1 a 10 semanas após o desaparecimento do HBsAg, podendo ser duradouro, transitório ou nunca existir. Sua presença é de grande importância uma vez que é o anticorpo neutralizante, o qual confere imunidade protetora⁽⁵⁾.

O presente estudo tem como objetivo apresentar a prevalência dos marcadores para hepatite B (HBsAg, Anti-HBc) entre doadores voluntários de sangue do Banco de Sangue de Santiago -RS, bem como, relacionar a importância da determinação de anti-HBc na prevenção da hepatite B transfusional.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização deste trabalho foram analisados os resultados das pesquisas sorológicas de marcadores de hepatite B, obtidos após triagem sorológica de rotina. O levantamento dos dados foi feito através dos registros encontrados nos arquivo do banco de sangue da cidade de Santiago/RS,

Recebido em 11/05/2006

Aprovado em 27/09/2006

¹Aluna do curso de Especialização em Análises Clínicas – Curso de Farmácia e Bioquímica – UFSM-RS

²Profª Drª Adjunta de imunologia Clínica. Departamento de Análise Clínicas e Toxicológicas. Curso de Farmácia e Bioquímica da Universidade Federal de Santa Maria-RS

entre o período de janeiro a dezembro de 2004. Os testes sorológicos foram realizados pela Central de Sorologia, em Porto Alegre - RS. Para determinação dos marcadores sorológicos HBsAg e anti-HBc foram utilizados testes imunoenzimáticos (ELISA) comerciais. A análise dos valores da alanina amino transferase (ALT), antes chamada TGP, realizados pelo método cinético, também foram considerados.

Casuística:

Entre os 2.451 doadores voluntários analisados, 450 (18,4%) eram do sexo feminino e 2001 (81,6%) do sexo masculino. A idade dos doadores variou entre 18 e 65 anos, com predominância da faixa etária entre 29-39 anos, sendo destes 37% do sexo masculino e 44% do sexo feminino.

RESULTADOS

Após a análise dos resultados sorológicos da pesquisa de HBsAg e anti-HBc, dos 2.451 doadores, 48 (1,95%), apresentaram reatividade para pelo menos um destes marcadores, sendo então esta a prevalência sorológica para Hepatite B nesta população (tabela 1)

TABELA I
Prevalência sorológica para marcadores de VHB (anti-HBc/HBsAg) na população estudada.

Marcadores	n°(%)
Anti-HBc reagente	39 (1,59)
Anti-HBc e HBsAg reagente	9 (0,36)
Anti-HBc e HBsAg não reagentes	2403(98,04)

Em relação às dosagens de ALT foi verificado predominância de valores normais entre os indivíduos não reagentes para HBsAg. Nos indivíduos portadores crônicos (HBsAg reagentes) a transaminase foi encontrada em níveis normais ou alterada em uma proporção semelhante nos dois grupos. (tabela 2)

TABELA II
Correlação dos marcadores sorológicos para o Vírus da Hepatite B e transaminases na população estudada.

Marcadores	Doadores em estudo n (%)
Anti-HBc reagente /ALT normal	38 (1,5)
Anti-HBc reagente / ALT alterada	1(0,04)
Anti-HBc e HBsAg reagente/ALT normal	5(0,20)
Anti-HBc e HBsAg reagente /ALT alterada	4(0,16)
Anti-HBc e HBsAg não reagente /ALT normal	2.412 (98,4)
Anti-HBc e HBsAg não reagente/ ALT alterada	1(0,04)

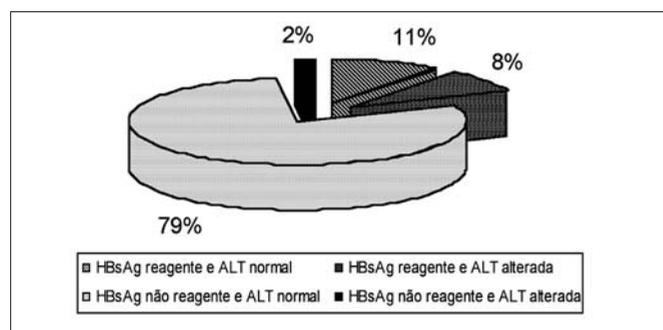


Figura 1 - Doadores de sangue voluntários Anti-HBc reagente correlacionado com HBsAg e ALT

Considerando apenas os indivíduos que apresentaram reatividade para o marcador Anti-HBc, foi verificado que a maior percentagem (79%) apresentava HBsAg não reagente e ALT normal. Já, quando os dois marcadores estiveram presentes, o nível da ALT não mostrou correlação alguma, podendo estar normal ou alterada, independente da reatividade dos mesmos (Figura 1).

DISCUSSÃO

A prevalência média, no Brasil, do VHB é em torno de 8%. Nos estados do Sul é da ordem de 0,3 % a 1,7 %, em São Paulo e Rio de Janeiro 1,0 a 2,1 % e no nordeste e na região amazônica 2,8 a 10,3 % (11). Isto demonstra a variação da prevalência entre os estados do Brasil para esta infecção.

Considerando a presença de reatividade para qualquer um dos marcadores pesquisados neste estudo, como índice de contato com o VHB, a prevalência encontrada de 1,9% , apresenta-se um pouco acima da descrita na literatura. Da mesma forma a prevalência de 0,36%, encontrada para anti-HBc + HBsAg reagentes, foi maior que a descrita em estudo realizado entre os doadores de sangue da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo (7), onde esta prevalência foi de 0,14%. De forma inversa, o presente estudo apresentou um menor número de casos reagentes, apenas para o marcador anti-HBc (1,59%)(tabela 1), contra 3,35% citado por Salles *et al.*(2003). Contudo, devemos considerar que estas prevalências podem variar de região para região, devido a diversos fatores como: triagem prévia do doador de sangue, perfil do doador que procura o banco de sangue, porcentagem de pessoas que doam sangue pela primeira vez, testes com princípios diferentes (automatizados ou não) empregados nas pesquisas dos marcadores para o VHB.

Apesar de a maioria dos testes utilizados para o diagnóstico sorológico ser normalmente bastante sensível e específico, estes não conseguem detectar todos os casos de Hepatite B. Diversos estudos mostram que, depois de realizada a triagem sorológica convencional (HBsAg/ anti-HBc), ao ser realizada a pesquisa de anti-HBs nos indivíduos não reagentes para HBsAg, mas reagentes para anti-HBc, 10 a 34% serão não reagentes também para anti-HBs, sendo classificados como anti-HBc isolado (2,3). A presença desse perfil sorológico continua sendo associada à: infecção antiga, com baixos níveis de anti- HBs; período de janela imunológica ; falsa reação positiva e portador crônico com HBsAg não detectável (8). Através de testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAT), Sucupira (1997) comprovou presença de VHB-DNA em 1,34% de doadores HBsAg negativo/anti-HBc positivo.

Entre os indivíduos que apresentaram reatividade para anti-HBc, 39(81%) não apresentaram reatividade para HBsAg (fig1). Apesar de no presente estudo não ter sido realizada a pesquisa do anticorpo anti-HBs nos indivíduos reagentes apenas para anti-HBc, considerando as prevalências citadas acima, teria-se entre 4 (10%) a 13 (34%) destes 39 doadores classificados como anti-HBc isolados. A detecção destes casos pode estar evitando além da transmissão da cepa selvagem (não detectada devido a baixa carga viral presente neste indivíduo com níveis indetectáveis de HBsAg) também a transmissão de cepas mutantes. Entre indivíduos que apresentam reatividade isolada para anti - HBc, o diagnóstico de cepa mutante apresenta uma prevalência entre 0,7 a 1% (12, 1).

Atualmente, a não detecção do marcador HBsAg, devido o aparecimento destas cepas mutantes tem preocupado. A sensibilidade analítica dos ensaios para a detecção do

HBsAg pode depender do genótipo ou subtipo do VHB ⁽¹³⁾. A hepatite B oculta (HBsAg não reagente com pesquisa molecular para o VHB-DNA positiva) tem sido responsável por casos de Hepatite B descrita em pacientes submetidos a hemodiálise ⁽⁶⁾. Em relação à dosagem de transaminase, todos os hemodialisados do estudo citado apresentaram ALT em níveis normais, o que vem de encontro com os dados descritos na tabela 2, onde apenas um dos doadores anti-HBc isolado apresentou ALT alterada.

CONCLUSÃO

Apesar de resultados isolados de anti-HBc poder significar apenas falsa reação positiva, levando ao descarte desnecessário de bolsas de sangue, pode também estar detectando infecção passada, com baixos níveis de anti-HBs. Mais relevante ainda é a possibilidade de esta determinação, mesmo que em pequeno número de casos, estar evitando a transmissão de cepas mutantes, ou cepas selvagens, que não são detectadas pelas limitações nos métodos convencionais ainda utilizados na triagem dos doadores de sangue, sendo então o custo benefício da determinação deste marcador favorável a sua realização.

REFERÊNCIAS

1. Alhababi F, Sallman TA, Tong CYW. The significance of anti-HBc only in the clinical virology laboratory. *J Clin Virol*; 27: 162-169, 2003.
2. Almeida Neto, C; Mendonça, MC; Sant'Anna, MVS *et al.* Análise epidemiológica de 222 doadores de sangue com o anti-HBc reativo e a AgHBs não reativo. In: Congresso Nacional do Colégio Brasileiro de Hematologia, 15, Águas de Lindóia, 1995. Anais p 83
3. Almeida Neto, C; Strauss, E; Sabino EC *et al.* Significance of Isolated Hepatitis B Core Antibody in Blood Donors From São Paulo. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 43(4): 203-208, 2001.
4. Hoofnagle, JH; Di bisceglie, A.M. Serologic diagnosis of acute and chronic viral hepatitis. *Semin. Livers Dis.* 11: 73-83, 1991.
5. Kroes, ACM; Quint, WGV & Heijntink, RA. Significance of isolated hepatitis B

core antibodies detected by enzyme immunoassay in a high risk population. *J. Med. Virol*, 35:96-100, 1991.

6. Minuk, GY; Sun, DF; Greenberg, R *et al.* Occult Hepatitis B Virus Infection in a North American Adult Hemodialysis Patient Population. *Hepatology*, 40(5): 1072-1077, 2004.
7. Salles, NA; Sabino, EC; Barreto CC *et al.* Descarte de bolsas de sangue e prevalência de doenças infecciosas em doadores de Sangue da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health* 13(2/3): 111-116, 2003.
8. Schiffman, RB; Rivers, SL; Sampliner, RE; Krammers, JE. Significance of isolated hepatitis B core antibody in blood donors. *Arch. Intern. Med.* 153:2261-2266, 1993.
9. Schreiber, GB; Busch, MP; Kleinman, SH; Korelitz, JJ. The risk of transfusion-transmitted viral infection. The Retrovirus Epidemiology Donor Study. *New Engl J Med*, 334: 1685-1690, 1996.
10. Sucupira, MCA. Prevalência do DNA do HBV em amostras de doadores de sangue com AgHBs negative e anti-HBc positive. São Paulo 1997. (Dissertação de Mestrado – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.
11. Tajana, J. Hepatitis B epidemiology in Latin América. *Vaccine*, 18:S17-S19, 2000.
12. Weber B, Melchior W, Gehrke R, Berger A, Rabenau, HF. Hepatitis B Virus (HBV) markers in isolated anti-HBc positive individuals. *J. Med Virol*, 64: 312-319, 2001.
13. Weber, B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. *J. Clin Virol*, 32: 102-112, 2005

ENDEREÇO PARA Correspondência:
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Centro de Ciências da Saúde – prédio 26
Universidade Federal de Santa Maria –
Campus Universitário - Camobi
Santa Maria – RS CEP: 97105 900
E.mail: sbeck@ig.com.br
FONE: (55) 3220 8464
FAX: (55) 3220 8018

IFCC WORLDLAB Fortaleza - Brasil

20º Congresso Internacional de Bioquímica e Medicina Laboratorial
35º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas
8º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica

28 de setembro - 2 outubro/2008

Local:

Centro de Convenções do Ceará

Vaginose bacteriana em mulheres carentes menopausadas e não menopausadas*

Bacterial vaginosis in pre-menopausal and pos-menopausal deprived women

Beatriz Schlatter Hasenack¹; Ana Karina Miquelão¹; Audrey de Souza Marquez¹; Éryka Helena Trapp e Pinheiro¹; Francielle Ferreira Soares²; Mariane Panichi Siqueira² & Renata da Silva Diniz²

RESUMO - O presente estudo visou determinar a prevalência de vaginose bacteriana (VB) em mulheres carentes menopausadas e não menopausadas e avaliar a presença de leucócitos nos esfregaços vaginais positivos para esta patologia. Duzentos e vinte e oito mulheres carentes residentes na zona leste de Londrina, Paraná, foram submetidas a exames laboratoriais que incluíam dosagens hormonais e bacterioscopia ao Gram de secreção vaginal. A VB foi definida através da bacterioscopia, segundo os critérios propostos por Nugent et al. Foram considerados com leucocitose os esfregaços com contagem de leucócitos ≥ 2 cruzes. Os dados foram analisados estatisticamente usando-se o teste t. A prevalência da VB nas mulheres menopausadas (81) e não menopausadas (147) foi de 27,2% e 26,5% respectivamente ($p = 0,4593$). Nas mulheres menopausadas com VB (22), a leucocitose ocorreu em 10 (45,5%) e nas mulheres não menopausadas com VB (39), esta condição foi observada em 13 (33,3%) ($p = 0,1783$). Este estudo sugere que as modificações do epitélio vaginal comumente evidenciadas nas mulheres menopausadas não alteram significativamente a prevalência da VB e demonstra que a esperada ausência de leucócitos nesta patologia pode não ser observada em um número expressivo de esfregaços vaginais.

PALAVRAS-CHAVE - vaginose bacteriana, menopausa, leucócitos.

SUMMARY - The aim of the present study was to determine the prevalence of bacterial vaginosis (VB) in pre-menopausal and pos-menopausal deprived women and to evaluate the presence of leucocytes in the positive smears for this pathology. Two hundred twenty eight women residents in the east region of Londrina, Paraná, were submitted to laboratory exams that include hormones dosages and Gram-stained-smear evaluation of vaginal sample. The VB was defined through Gram-stain-smear evaluation according to the criteria proposed by Nugent et al. It was considered with leukocytosis those smears that presented the quantification of leukocytes ≥ 2 points. The data was analyzed statistically using t-test. The prevalence of VB in pos-menopausal (81) and pre-menopausal (147) women was 27,2% and 26,5%, respectively ($p = 0,4593$). In pos-menopausal women presenting VB (22), 10 (45,5%) presented leukocytosis and in pre-menopausal women presenting VB (39), this condition was evidenced in 13 (33,3%) ($p = 0,1783$). This study suggests that the vaginal epithelium modifications commonly observed in pos-menopausal women do not alter significantly the prevalence of VB and demonstrates that the expected absence of leukocytes in this pathology may be not observed in an important number of vaginal smears.

KEYWORDS - bacterial vaginosis, menopause, leukocytes.

INTRODUÇÃO

A vaginose bacteriana (VB) foi originalmente descrita por GARDNER & DUKES (1955) como uma vaginite não específica caracterizada por secreção vaginal acinzentada, de odor fétido, com pH mais elevado que o normal e com mínima inflamação local, tendo como agente causal a *Gardnerella vaginalis* (*Haemophilus vaginalis*). Atualmente, sabe-se que *G. vaginalis* não é o único agente envolvido na VB, mas que esta é resultante de uma alteração da microbiota vaginal em que os lactobacilos (Bacilos de Döderlein), normalmente predominantes, são substituídos por uma microbiota mista que inclui, além de *G. vaginalis*, outros microrganismos anaeróbios como *Bacteroides* spp., *Mobiluncus* spp., *Peptoestreptococcus* spp. e microaerófilos, como *Mycoplasma hominis* (NUGENT et al., 1991). Inicialmente, a VB foi considerada uma doença sexualmente transmissível, porém como alguns estudos reportaram seu diagnóstico em mulheres virgens, o caráter sexual de transmissão desta enfermidade permanece uma incógnita até hoje. Em contrapartida, certos fatores de risco associados ao desenvolvimento desta enfermidade já foram definidos; alguns, inclusive, relacionados com fatores sexuais, como uso de dispositivo intra-uterino (DIU), idade, número de parceiros sexuais, início da vida sexual e número de relações sexuais semanais (ZANINI-KOSLINSKI, 1995;

WANG, 2000; AVILÉS et al., 2004).

A grande importância de se diagnosticar corretamente a VB é decorrente da associação desta enfermidade com vários problemas obstétricos e seqüelas ginecológicas, como infecções do trato genital superior (PAAVONEN et al., 1987; ESCHENBACH et al., 1988; HAGGERTY et al., 2004), aumento do risco de aquisição e transmissão do vírus da imunodeficiência adquirida (HASHEMI et al., 2000; SCHMID et al., 2000), aquisição do vírus Herpes Simplex tipo 2 (CHERPES et al., 2003) e aumento do risco para o desenvolvimento de infecção do trato urinário (HARMANLI et al., 1995; HILLERBRAND et al., 2002). Assim, o médico ginecologista, após avaliar sua paciente com queixas de leucorréia ou de corrimento vaginal mal-cheiroso, faz sua hipótese diagnóstica e procura confirmá-la com exames clínicos e laboratoriais.

Segundo AMSEL et al (1983), o diagnóstico clínico de VB é confirmado quando pelo menos três dos seguintes critérios estão presentes: 1) corrimento delgado, homogêneo; 2) pH superior a 4,5; 3) teste das aminas positivo; e 4) presença de *Clue cells*. A sensibilidade e o valor preditivo positivo destes critérios são de 90% (WANG, 2000). Considerando que mais da metade das mulheres com VB é assintomática, a utilização destes critérios para o diagnóstico desta condição muitas vezes é inconclusiva (MITCHEL, 2004).

Dentre os métodos laboratoriais, a técnica de coloração de

Recebido em 13/07/2005

Aprovado em 29/06/2006

*Trabalho desenvolvido no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Norte do Paraná, Londrina, PR

¹Docentes do Curso de Farmácia e Bioquímica da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR)

²Alunos do Curso de Farmácia e Bioquímica da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR)

Papanicolau para esfregaços de secreções vaginais é considerada a de menor sensibilidade, embora de razoável sensibilidade, tanto para diagnosticar VB como para identificar os morfotipos de *Mobiluncus* spp.. Paralelamente, a observação de esfregaços corados por Gram possibilita a detecção do desequilíbrio bacteriano, pois permite a visualização e quantificação de bacilos Gram positivos (sugestivos de lactobacilos), cocobacilos Gram variáveis (sugestivos de *G. vaginalis*) e bacilos Gram negativos curvos (sugestivos de *Mobiluncus* spp.) (JUNIOR & CAVALCANTE, 2004). NUGENT *et al.* (1991) sugeriram um sistema de escores (0 a 10) para o diagnóstico da VB, o qual é resultante da soma de valores diferenciados para a observação quantitativa dos seguintes morfotipos na bacterioscopia: lactobacilos, *G. vaginalis* ou *Bacteroides* spp. e bacilos Gram negativos curvos. Assim, a VB seria confirmada quando o escore resultasse em valores de 7 a 10 (tabela 1). Apesar de freqüentemente encontradas na bacterioscopia de secreções vaginais de pacientes com VB, as clue cells ou células-alvo (células epiteliais escamosas cobertas por cocobacilos sugestivos de *G. vaginalis*, que deixam os bordos das células obscurecidos, principalmente quando o conteúdo vaginal é submetido ao exame a fresco) não foram incluídas na padronização da interpretação deste exame pelos referidos autores. A cultura raramente é realizada de rotina, pois é de difícil interpretação, visto que *G. vaginalis* é isolada de 40 a 50% das mulheres saudáveis (SPIEGEL *et al.*, 1983; MAZZULLI *et al.*, 1990).

A VB usualmente não é acompanhada por uma resposta inflamatória, razão da utilização do sufixo "ose", distinguindo este quadro daqueles causados por *Candida* spp. e *Trichomonas vaginalis*, classicamente denominados de vaginites (SPIEGEL, 1991; CATLIN, 1992). A possível razão para a ausência de leucócitos na secreção parece estar relacionada com a inibição da quimiotaxia destas células em consequência da produção de ácido succínico pelas bactérias normalmente presentes nesta condição, como *Prevotella* spp. e *Mobiluncus* spp. (AL-MUSHRIF *et al.*, 2000). Alguns autores, entretanto, detectaram um número aumentado de leucócitos em quadros de VB, enquanto outros sugerem que a presença de leucócitos polimorfonucleares em abundância não é compatível com esta síndrome, gerando controvérsias em relação ao seu diagnóstico e à utilização do termo vaginose para definir esta patologia (DEMIREZEN, 2003; JUNIOR & CAVALCANTE, 2004).

Muito se especula sobre a influência da microbiota vaginal normal sobre a incidência das infecções genitais femininas. Sabe-se que a vagina é um meio dinâmico, complexo e que possui uma microbiota residente formada por bactérias aeróbias e anaeróbias, cuja composição varia na mesma mulher em função de sua idade, fase do ciclo menstrual e ocorrência de gestação (SPIEGEL, 1991; VÁSQUEZ *et al.*, 2002; MITCHEL, 2004). Dentre os fatores que influem na manutenção da microbiota normal da vagina está a acidez, que se relaciona diretamente com a quantidade de ácido láctico. Os lactobacilos são os microrganismos predominantes na vagina da mulher no menacme. São os responsáveis pela manutenção do pH baixo local, e devido à produção de peróxido de hidrogênio, restringem o crescimento de microrganismos potencialmente patogênicos (ESCHENBACH *et al.*, 1989). Também, os níveis de estrogênios interferem no pH vaginal, pois estes hormônios estão relacionados com a deposição de glicogênio nas células vaginais, o qual é decomposto em monossacarídeos pelas fosforilases e glicosidases da camada muscular da vagina e, posteriormente, convertido em ácido láctico pelos lactobaci-

los. Quando a mulher inicia o período da menopausa, ocorre diminuição de estrogênio, o epitélio vaginal torna-se extremamente delgado, ocasionando diminuição ou até ausência de glicogênio. Acredita-se que a redução do glicogênio seja responsável, pelo menos parcialmente, pela diminuição de lactobacilos e elevação do pH evidenciadas na vagina destas mulheres. Esta mudança do ambiente permite que a vagina seja colonizada por bactérias patogênicas e, teoricamente, predispõe estas mulheres às infecções genitais (HILLIER & LAU, 1997; CARDOSO *et al.*, 2000; HALBE *et al.*, 2000; GALHARDO *et al.*, 2001).

A prevalência da VB é variável, podendo ser desde 4% em estudantes universitárias, 10% em mulheres em idade reprodutiva e, na população geral, até 50% em populações de alto risco para uma doença sexualmente transmissível (WANDERLEY *et al.*, 2001; ÁVILES *et al.*, 2004). Em verdade, a prevalência exata é ignorada pelo fato desta enfermidade não ser uma doença de notificação compulsória (CUNHA, 1996). Nas mulheres menopausadas, em função das alterações vaginais anteriormente descritas, a prevalência da VB é particularmente controversa (WANDERLEY *et al.*, 2001).

Neste contexto, o presente estudo visou determinar a prevalência de VB em mulheres carentes, menopausadas e não-menopausadas, e avaliar a presença de leucócitos nos esfregaços vaginais positivos para esta patologia.

MATERIAIS E MÉTODOS

De setembro de 2003 a setembro de 2004 foram investigadas 228 mulheres carentes com idade entre 14 e 82 anos, residentes na área A da zona leste da cidade de Londrina (bairros Jardim Monte Cristo, Santa Fé e Marabá), Paraná, as quais foram submetidas a exames laboratoriais que incluíam as dosagens dos hormônios luteinizante (LH), folículo estimulante (FSH) e estradiol, e exame a fresco e bacterioscopia ao Gram de secreção de fundo de saco vaginal. A coleta das amostras biológicas foi realizada em local apropriado no Centro da Pastoral Santana, situado na região Leste de Londrina/PR. Todas as pacientes que aceitaram participar da pesquisa responderam a um questionário com o objetivo de avaliar a presença de sintomas genitourinários, doenças de base, uso de medicamentos e situação sócio-econômica. Adicionalmente, ao final do questionário, as mulheres participantes assinaram um termo de consentimento autorizando a realização dos exames e a utilização dos resultados dos mesmos para fins de pesquisa.

As amostras colhidas foram transportadas até o Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Norte do Paraná (LAC), onde foram processadas conforme os respectivos manuais de Procedimentos Operacionais Padrão (POP).

De acordo com os resultados das dosagens hormonais e presença de ciclos menstruais regulares, as mulheres foram classificadas em menopausadas e não menopausadas. Foram consideradas mulheres menopausadas àquelas que relatavam ausência de ciclos menstruais e cujas dosagens hormonais se enquadravam nos seguintes valores: FSH \geq 20 mUI/ml, LH \geq 15 mUI/ml, estradiol \leq 60ng/ml.

Os esfregaços corados pelo método de Gram foram analisados em microscópio óptico com objetiva de imersão com a finalidade de determinar a microbiota presente e quantificar o número de leucócitos e células epiteliais. A VB foi definida de acordo com os critérios propostos por Nugent *et al.*, após a conversão da leitura realizada em cruzes utilizada rotineiramente pelo LAC para a quantificação padronizada pelos autores (número de microrganismos ob-

servados por campo de imersão) (tabela 1). A presença de leucócitos foi contabilizada empregando-se a quantificação numérica em cruces (0 até 4 cruces). Foram considerados com leucocitose os esfregaços com contagem de leucócitos ≥ 2 cruces.

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente por meio do teste t e o nível de significância foi fixado em 5% ($p \leq 0,05$).

TABELA I
Sistema de escores para diagnóstico de vaginose bacteriana proposto por Nugent et al. (1991) e adaptado para o resultado padronizado no Laboratório de Análises Clínicas da UNOPAR (LAC):

Gradiente de Nugent			
Morfologia dos microrganismos	Número de morfotipos observados por campo de imersão (padronização de Nugent et al.)	Resultado em cruces (quantificação padronizada pelo LAC)	Escore
Lactobacilos	>30	3+ ou 4+	0
	5-30	2+	1
	1-4	1+	2
	- de 1	raros	3
	0	ausentes	4
acilos Gram-variáveis curvos, sugestivos de <i>Mobiluncus spp.</i>	>5	2+, 3+ ou 4+	2
	1-4	raros, 1+	1
	0	ausentes	0
<i>Gardnerella</i> ou <i>Bacteroides spp.</i>	>30	3+ ou 4+	4
	5-30	2+	3
	1-4	1+	2
	- de 1	raros	1
	0	ausentes	0

Soma dos escores:
 • 0 a 3: normal
 • 4 a 6: indefinido
 • 7 a 10: vaginose bacteriana

RESULTADOS

Das 228 mulheres analisadas, 81 (35,5%) eram menopausadas e 147 (64,5%) eram não menopausadas. A prevalência da VB (escore de Nugent ≥ 7) nas mulheres menopausadas e não menopausadas foi de 27,2% e 26,5% respectivamente ($p = 0,4593$). Nas mulheres menopausadas com VB (22), a leucocitose ocorreu em 10 (45,5%) e nas mulheres não menopausadas com VB (39), esta condição foi observada em 13 (33,3%) ($p = 0,1783$). Os resultados obtidos estão impressos na tabela 2.

TABELA II
Diagnóstico de vaginose bacteriana (VB) e presença de leucócitos na avaliação microscópica de esfregaços vaginais corados ao Gram das mulheres menopausadas e não menopausadas estudadas:

	Mulheres menopausadas	Mulheres não menopausadas	Total	ANÁLISE ESTATÍSTICA (teste t)
n	81 (35,5%)	147 (64,5%)	228 (100%)	-
VB	22 (27,2%)	39 (26,5%)	61 (26,8%)	$p = 0,4593$
Leucócitos na VB	10 (45,5%)	13 (33,3%)	23 (37,7%)	$p = 0,1783$

Nas mulheres com VB, em nenhum dos esfregaços corados pelo método de Gram foi detectado leveduras com ou sem pseudo-hifas sugestivas de *Candida spp.*, assim como, no exame a fresco, não foram visualizados protozoários flagelados sugestivos de *Trichomonas vaginalis*, descartando a possibilidade de co-infecção por estes agentes.

DISCUSSÃO

A prevalência da VB varia de acordo com a população es-

tudada. Esta variação parece estar relacionada com o nível sócio econômico da paciente avaliada, com sua idade, além de depender do método de diagnóstico utilizado (ADAD et al., 2001). Neste trabalho, observou-se que a prevalência da VB diagnosticada pela bacterioscopia corada ao Gram, segundo os critérios propostos por Nugent et al., nas mulheres menopausadas e não menopausadas foi praticamente equivalente, 27,2 e 26,5%, respectivamente ($p = 0,4593$). Este resultado não está de acordo com outros estudos, os quais reportam uma menor prevalência desta condição nas mulheres acima dos 40 anos (ADAD et al., 2001) e nas mulheres menopausadas (CAUCI et al., 2002). Na verdade, a constatação da menor prevalência desta patologia em mulheres menopausadas representa aparentemente um paradoxo, visto que a fase da menopausa é acompanhada por um impressionante decréscimo na colonização vaginal por lactobacilos e aumento do pH, fatores supostamente predisponentes às infecções vaginais, particularmente àquelas relacionadas com pH superiores a 4,5, como a VB. HILLIER & LAU (1997), estudando a microflora vaginal de 73 mulheres pós-menopausadas não submetidas à reposição estrogênica, detectaram diminuição da colonização por lactobacilos facultativos e leveduras nestas mulheres quando comparadas a outras em idade fértil. Três microrganismos associados com VB - *G. vaginalis*, *Prevotella bivia* e *Mycoplasma hominis* - foram também isolados com frequência menor. Estes resultados, segundo os autores, ajudam a explicar o aumento da frequência de VB nas mulheres férteis. No entanto, WANDERLEY et al. (2001) relataram uma prevalência similar de VB em mulheres inférteis (idade média 30,5 anos) e mulheres menopausadas (idade média 52 anos), alertando para a possibilidade da existência de outros fatores interferentes na frequência desta infecção, como uso de duchas vaginais, resistência individual às modificações da microbiota local, entre outros. Assim, para melhor compreender o resultado obtido em nossa pesquisa, estes fatores e outros, como número de parceiros sexuais e número de relações sexuais, precisam ser analisados.

O termo "vaginose bacteriana" ao invés de "vaginose inespecífica" foi proposto pelo sueco Westrom em 1984 porque as bactérias envolvidas nesta síndrome já estavam, na época, definidas e porque nenhuma reação inflamatória normalmente é detectada neste quadro (CUNHA, 1996). No nosso estudo, a presença aumentada de leucócitos (2 cruces) na bacterioscopia ocorreu em 45,5% e 33,3% dos esfregaços vaginais das mulheres menopausadas e não menopausadas, respectivamente. Apesar da diferença das porcentagens nos dois grupos não ter sido significativa ($p = 0,1783$), seus valores são bastante elevados, considerando o conceito original de que esta síndrome infecciosa não é acompanhada por uma inflamação local importante. JUNIOR & CAVALCANTE (2004) também detectaram leucocitose em uma porcentagem significativa de esfregaços de pacientes com VB corados pelo método de Gram. Estes autores reportaram que na presença de bacilos Gram negativos curvos sugestivos de *Mobiluncus spp.*, um maior número de leucócitos foi observado, especificamente em 57,5% dos casos, e que quando o escore de Nugent foi de 9 e 10, a leucocitose ocorreu em 25,6 e 37,2, respectivamente. A associação de *Mobiluncus spp.* com um maior número de leucócitos é surpreendente, já que este microrganismo justamente está relacionado com a inibição da resposta inflamatória observada nos quadros típicos de VB, segundo AL-MUSHRIF et al. (2000). Por outro lado, DONNERS et al. (2000), na tentativa de determinar uma relação

entre os achados microscópicos de amostras de secreção vaginal e os resultados da cultura, presença de lactato e succinato no conteúdo vaginal e concentração de citocinas selecionadas, concluíram que existe uma correlação entre a presença de leucocitose vaginal e a concentração de uma variedade de citocinas, demonstrando que fatores inerentes ao hospedeiro, além daqueles relacionados com a microbiota presente, também interferem na concentração de leucócitos em amostras vaginais. No nosso levantamento, em nenhum dos casos diagnosticados de VB foram identificados *Candida spp.* e *Trichomonas vaginalis*, os quais poderiam justificar a presença de leucócitos nas secreções de fundo de saco vaginal estudadas. Portanto, a leucocitose observada em mais de 30% dos esfregaços vaginais de pacientes com VB no nosso estudo poderia ser decorrente do próprio quadro infeccioso, da influência causada pela produção de determinadas citocinas ou eventualmente poderia ser explicada pela concomitância de infecções em outro local do trato genital, como endocervicite causada por *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, ou *Mycoplasma hominis*, as quais não foram pesquisadas nesta população. Em conclusão, o presente estudo sugere que as modificações do epitélio vaginal comumente evidenciadas nas mulheres menopausadas não alteram significativamente a prevalência da VB e demonstra que a esperada ausência de leucócitos nesta patologia pode não ser observada em um número expressivo de esfregaços vaginais.

REFERÊNCIAS

- ADAD, S.J.; LIMA, R.V.; SAWAN, Z.T.E. *et al.* Frequency of *Trichomonas vaginalis*, *Candida sp* and *Gardnerella vaginalis* in cervical-vaginal smears in four different decades. *Sao Paulo Med J*, v.119, n.6, p.200-205, 2001.
- AL-MUSHRIF, S.; ELEY, A. & JONES, B.M. Inhibition of Chemotaxis by Organic Acides from Anaerobes may Prevent a Purulent Response in Bacterial Vaginosis. *J Med Microbiol*, v.49, n.11, p.1023-1030, 2000.
- AMSEL, R. P.A.; TOTTEN, C.A.; SPIEGEL, K.C.S. *et al.* Nonspecific vaginitis: diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am J Med*, v. 74, p.14-22, 1983.
- AVILÉS, A.G.P.; VAZQUEZ, R.M.; ZARAGOZA, C.O. *et al.* Factores de riesgo asociados a vaginosis bacteriana. *Aten Primaria*, v. 34, n.7, p.360-365, 2004.
- CARDOSO, M.S.R.; RAMOS, E.S.N.; CASTRO, A.D.P. *et al.* Prevalência de vaginites específicas e inespecíficas em mulheres na pós-menopausa. *RBAC*, v.32, n.4, p.275-277, 2000.
- CATLIN, B.W. *Gardnerella vaginalis*: Characteristics, Clinical Considerations, and Controversies. *Clin Microbiol Rev*, v.5, n.1, p.213-237, 1992.
- CAUCI, S.; DRIUSSIS, S.; SANTO, D. *et al.* Prevalence of Bacterial Vaginosis and Vaginal Flora Changes in Peri-and Postmenopausal Women. *J Clin Microbiol*, v.40, n.6, p.2147-2152, 2002.
- CHERPES, T.L.; MEYN, L.A.; KROHN, M.A. *et al.* Association between Acquisition of Herpes Simplex Virus Type 2 in Women and Bacterial Vaginosis. *Clin Infect Dis*, v.37, p.319-325, 2003.
- CUNHA, F. Vaginose Bacteriana: um Enigma Ecológico e um Equívoco Semântico. *Rev AMRIGS*, v.40, n.2, p.85-87, 1996.
- DEMIREZEN, S. Review of Cytologic Criteria of Bacterial Vaginosis: Examination of 2,841 Papanicolaou-stained Vaginal Smears. *Diagn Cytopathol*, v.29, n.3, p.156-159, 2003.
- DONDERS, G.G.; BOSMANS, E.; DEKEERSMAECKER, A. *et al.* Pathogenesis of abnormal vaginal bacterial flora. *Am J Obstet Gynecol*, v.182, n. 4, p. 872-878, 2000.
- ESCHENBACH, D.A.; HILLIER, S.L.; CRITCHLOW, C.W. *et al.* Diagnosis and clinical manifestations of bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol*, v.158, p. 819-828, 1988.
- ESCHENBACH, D.A.; DAVICK, P.R.; WILLIAMAS, B.L. *et al.* Prevalence of Hydrogen Peroxide-Producing *Lactobacillus* Species in Normal Women and Women with Bacterial Vaginosis. *J Clin Microbiol*, v.27, n.2, p.251-256, 1989.
- GALHARDO, C.L.; BARACAT, E.C.; HAIDAR, M.A. *et al.* Flora Vaginal e Climatério. *Femina*, v.29, n.4, p.241-244, 2001.
- GARDNER, H. & DUKES, C. *Haemophilus vaginalis* vaginitis: a newly defined specific infection previously classified "nonspecific vaginitis" *Am J Obstet Gynecol*, v.68, p.962-976, 1955.
- HAGGERTY, C.L.; HILLIER, S.L.; BASS, D.C. *et al.* Bacterial Vaginosis and Anaerobic Bacteria Are Associated with Endometritis. *Clin Infect Dis*, v.39, p.990-995, 2004.
- HALBE, H.W.; RAMOS, L.O. & SAAC, R.V.C. Corrimento Vaginal. In: HALBE, H.W. *Tratado de Ginecologia*, 3a ed. São Paulo: Ed. Rocca, p. 612-618, 2000.
- HARMANLI, O.H.; CHENG, G.Y.; NYIRJESY, P. *et al.* Urinary tract infections in women with bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol*, v.95, n.5, p.710-712, 1995.
- HASHEMI, F.B.; GHASSEMI, M.; FARO, S. *et al.* Induction of human immunodeficiency virus type 1 expression by anaerobes associated with bacterial vaginosis. *J Infect Dis*, v.181, p.1574-1580, 2000.
- HILLEBRAND, L.; HARMANLI, O.H.; WHITEMAN, V. *et al.* Urinary tract infections in pregnant women with bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol*, v.196, n.5, p.916-917, 2002.
- HILLIER, S.L.; LAU, R.J. Vaginal Microflora in Postmenopausal Women Who Have Not Received Estrogen Replacement Therapy. *Clin Infect Dis*, v.25, suppl.2, p.S123-S126, 1997.
- JUNIOR, J.E. & CAVALCANTE, D.I.M. Contagem de Morfotipos de *Mobiluncus sp* e Concentração de Leucócitos em Esfregaços Vaginais de Pacientes com Vaginose Bacteriana. *RBGO*, v.26, n.3, p.221-225, 2004.
- MAZZULLI, T.; SIMOR, A.E. & LOW, D.E. Reproducibility of Interpretation of Gram-Stained Vaginal Smears for the Diagnosis of Bacterial Vaginosis. *J Clin Microbiol*, v.28, n.7, p.1506-1508, 1990.
- MITCHELL, H. ABC of sexually transmitted infections: Vaginal discharge – causes, diagnosis and treatment. *BMJ*, v.328, p.1306-1308, may 2004.
- NUGENT, R.P.; KROHN, M.A. & HILLIER, S.L. Reliability of Diagnosing Bacterial Vaginosis Is Improved by a Standardized Method of Gram Stain Interpretation. *J Clin Microbiol*, v.29, n.2, p. 297-301, 1991.
- PAAVONEN, J.; TEISALA, K.; HEINONEN, P.K. *et al.* Microbiological and histopathological findings in acute pelvic inflammatory disease. *Br J Obstet Gynaecol*, v.94, n.5, p. 454-60, 1987.
- SCHMID, G.; MARKOWITZ, L.; JOESOEFF, R. *et al.* Bacterial vaginosis and HIV infection. *Sex Transm Infect*, v.76, p.3-4, 2000.
- SPIEGEL, C.A. Bacterial Vaginosis. *Clin Microbiol Rev*, v.4, n.4, p.485-502, 1991.
- SPIEGEL, C.A.; AMSEL, R. & HOLMES, K.K. Diagnosis of Bacterial Vaginosis by Direct Gram Stain of Vaginal Fluid. *J Clin Microbiol*, v.18, n.1, p.170-177, 1983.
- VÁSQUEZ, A.; JAKOBSSON, T.; AHRNÉ, S. *et al.* Vaginal *Lactobacillus* Flora of Healthy Swedish Women. *J Clin Microbiol*, v.40, n.8, p.2746-2749, 2002.
- WANDERLEY, M.S.; MIRANDA, C.R.R.; FREITAS, M.J.C. *et al.* Vaginose Bacteriana em Mulheres com Infertilidade e em Menopausadas. *RBGO*, v.23, n.10, p.641-646, 2001.
- WANG, J. Bacterial vaginosis. *Prim Care Update Ob Gyns*, v.7, n.5, p.181-185, 2000.
- ZANINI-KOSLINSKI, R.M. Vaginose Bacteriana. *Femina*, v.23, n.3, p.213-219, 1995.

Endereço para correspondência:

Beatriz Schlatter Hasenack

Rua Juscelino Kubitschek, 54. Bairro Jardim Boa Vista.

CEP: 86200-000 - Ibioporã, PR.

E-mail: beatriz.hasenack@unopar.br

Caracterização dos biofilmes formados em filtros de carvão ativado de sistemas de purificação de água em laboratórios clínicos

Characterization of biofilmes formed in filters of activated coal of systems of purificação of water in clinical laboratories

Carlos Henrique Pessôa de Menezes e Silva¹; Alessandro Pereira Lins¹; Caroline Sathler Oliveira da Cruz¹; Wenzel Greenberg² & Thomas Stewart²

RESUMO - A água purificada constitui o principal componente de muitos reagentes, tampões e diluentes usados nos laboratórios de análises clínicas. Ela é também um componente indireto dos testes quando é usada para lavar e sanitizar instrumentos e equipamentos laboratoriais. A água purificada também é uma causa potencial de erros no laboratório. Qualquer tipo de água purificada deve ser validada de acordo com o seu uso e propósito. Neste estudo avaliou-se a diversidade microbiana dos biofilmes encontrados em filtros de carvão ativado de sistemas de purificação de água de 8 laboratórios de análises clínicas através de três métodos (análise com microscopia eletrônica e por coloração fluorescente com acridina-orange, sequenciamento do DNA ribossomal (rDNA) 16S, amplificação e sequenciamento dos 165 subclones de comunidades microbianas encontradas nos biofilmes e pesquisa de bactérias heterotróficas na água dos filtros de carvão ativado). Somente os métodos moleculares identificaram todas as bactérias nos biofilmes, as quais representaram 22 gêneros. Os microrganismos mais comumente encontrados de acordo com as análises de rDNA 16S foram aqueles pertencentes à família *Pseudomonadaceae* (37%). Os resultados indicaram que o conteúdo microbiano dos filtros de carvão ativado foi maior pela manhã, antes do início das atividades do laboratório, do que durante o dia. Também foram analisados o carbono orgânico total (TOC) e o carbono orgânico assimilável (AOC) e os resultados mostraram que a ocorrência dos biofilmes também estavam associados com valores de TOC e AOC maiores que 0,2 mg/L e 52,4 µg/L, respectivamente. Os resultados confirmaram as limitações das técnicas baseadas em cultura para detectar e identificar as bactérias nos biofilmes formados em filtros de carvão ativado nos laboratórios clínicos. Para realizar um adequado tratamento de purificação da água para fins laboratoriais é importante compreender as necessidades específicas requeridas para o uso de água reagentes. Entendendo que as impurezas da água podem afetar os testes laboratoriais, torna-se crítico detectar as mudanças na qualidade do sistema e as análises de controle devem ser realizadas periodicamente para detectar e estabelecer quando deve ser feita a manutenção e troca dos filtros.

PALAVRAS-CHAVE - Água reagentes para laboratórios clínicos, água purificada, biofilmes.

SUMMARY - Purified water constitutes the major component of many reagents, buffers, and diluents used in clinical laboratory testing. It can also become an indirect component of tests when it is used for washing and sanitizing instruments and laboratory ware. Purified water also is a potential cause of laboratory error. Any type of purified water should be validated as fit for purpose before being used in clinical laboratory testing. In this study we investigated the microbial diversity of biofilms found in activated carbon filters in water purification systems in 8 clinical laboratory by three methods (microscopic examination by scanning electron microscopy and acridine-orange fluorescent staining, 16S ribosomal DNA (rDNA) sequencing and culture-independent direct amplification and sequencing of 165 subclones from community biofilm 16S rDNA, and heterotrophic plate count cultivated in water from activated carbon filters). Only molecular methods identified all bacteria in biofilms, which represented 22 genera. The most common organisms, as shown by analyses of 16S rDNA, belonged to the family *Pseudomonadaceae* (37%). Results indicated that the microbial content of activated carbon filters were higher on overnight standing than by flushing the next day. Total organic carbon (TOC) and assimilable organic carbon (AOC) were also analysed and the results showed that the occurrence of biofilms also could be associated with TOC and AOC levels greater than 0.2 mg/L and 52.4 µg/L, respectively. The results reflect the limitations of culture-based techniques to detect and identify bacteria in biofilms from activated carbon filters in the clinical laboratory. In order to provide the proper purification system, it is important to understand the specific needs and requirements of laboratory grade water. Understanding water impurities that affect laboratory testing is critical to detect changes in the quality of system, and the measurements should be trended to detect drift and anticipate maintenance and change of filters.

KEYWORDS - Clinical laboratory reagent water, purified water, biofilms.

INTRODUÇÃO

Água utilizada em laboratórios de análises clínicas recebe uma denominação e apresenta especificações diferentes daquela destinada a fins farmacêuticos, sendo denominada "água reagentes" e, de acordo com sua utilização, requer maior ou menor grau de pureza. No Brasil, muitos laboratórios clínicos seguem as especificações de algumas agências regulamentadoras que definem os requisitos para o controle de qualidade e utilização da água reagentes⁶.

Dentre os órgãos que definem a qualidade da água para laboratórios estão o National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, atual Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI], a American Society for Testing Materials [ASTM] e o College of American Pathologists [CAP]). Estas entidades classificam quatro tipos de água reagentes que são selecionadas pelos profissionais dos laboratórios clínicos de acordo com as necessidades dos seus ensaios, definindo então o tipo de água, suas especificações, métodos de obtenção e os controles de qualidade que devem ser realizados para manter a integridade da água que será utilizada.

Recebido em 10/04/2006

Aprovado em 11/10/2006

Prêmio Newprov de 2006

¹Centro Tecnológico de Análises (CETAN), Vila Velha/ES, Brasil.

²Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta/GA, USA.

De acordo com o documento C3-A3 do então NCCLS16, a água reagente é classificada em:

- Água reagente tipo I: água com a melhor qualidade, ideal para métodos de análise que requerem mínima interferência e máxima precisão e exatidão (ex: dosagem de elementos e metais pesados, espectrometria, absorção atômica, procedimentos enzimáticos, eletroforese, cromatografia líquida de alta performance (HPLC), preparo de solução-padrão e tampão e processos que requerem baixa carga microbiana). Deve ser utilizada no momento em que é produzida e não pode ser estocada, para evitar contaminação.
- Água reagente tipo II: uso geral em laboratórios para procedimentos em que é tolerada a presença de microrganismos, resistividade baixa e quantidade maior de sílica (ex: métodos analíticos e procedimentos bioquímicos não enzimáticos, procedimentos em imunologia e hematologia). Deve ser utilizada no mesmo dia da coleta.
- Água reagente tipo III: utilizada em procedimentos que requerem a remoção de contaminantes específicos, como endotoxinas, substâncias orgânicas ou outros não especificados, como parâmetros obrigatórios para os demais tipos de água.

O órgão regulamentador mais comumente seguido no Brasil é o CLSI/NCCLS, que define os parâmetros para a classificação dos tipos de água citados, sendo que cada um deles deve atender às especificações estabelecidas para cada tipo de água (Tabela-1).

TABELA I

Parâmetros para a qualidade da água reagente segundo o CLSI/NCCLS.

Parâmetros	Água Tipo I	Água Tipo II	Água Tipo III
pH a 25 °C	NA	NA	5,0 a 8,0
Resistividade mínima a 25 °C (MΩ/cm)	≥ 10	≥ 2	≥ 1
Condutividade máxima a 25 °C (µS/cm)	≤ 0,1	≤ 0,5	≤ 10
Sílica (mg/L)	≤ 0,05	≤ 0,1	≤ 1
Sólidos totais (mg/L)	0,1	1	5
Carbono orgânico total – TOC (mg/L)	≤ 0,05	≤ 0,2	1
Cloro livre	Zero	Zero	Zero
Contagem de bactérias heterotróficas (UFC/mL)	≤ 10	10	NA

NA = Não aplicado

Um sistema de tratamento de água deve ser projetado em função das impurezas existentes na água de alimentação. Existem quatro tipos principais de contaminantes na água de alimentação que entra no sistema de tratamento de água, cuja remoção é de fundamental importância para preservar a vida útil dos aparelhos, bem como dos filtros e não sobrecarregar o sistema. Os principais contaminantes existentes na água de alimentação são:

- **Contaminantes particulados:** formados por substâncias orgânicas e inorgânicas insolúveis e suspensas na água. Tem origem na própria fonte de água, devido a resíduos liberados do metal da tubulação, lama, poeira, sílica, material orgânico e mineral, podendo formar partículas em suspensão e entupir filtros, válvulas e membranas, além de auxiliar no processo de formação de biofilmes.
- **Contaminantes inorgânicos dissolvidos:** formados por íons como cálcio, magnésio, ferro, cloretos, fosfatos, além de metais pesados, gases como o CO₂ e silicatos.
- **Contaminantes orgânicos dissolvidos:** tem origem na natureza, decorrentes da degradação vegetativa, pesticidas, solventes, compostos orgânicos e resíduos de tecidos animais e vegetais. O carbono orgânico é utilizado pelas bactérias heterotróficas para a produção de novos materiais celulares e como fonte de energia. A maior parte do carbono orgânico na água de alimentação tem origem de vegetais degradados que caem nos leitos dos rios e passam para o sistema de abastecimento público. Estes compostos podem incluir ácidos fúlvicos, carboidratos poliméricos,

proteínas e ácidos carboxílicos. O carbono orgânico assimilável (Assimilable Organic Carbon, AOC) é a porção do carbono orgânico total (Total Organic Carbon, TOC) que pode ser prontamente utilizada pelos organismos aquáticos para o seu crescimento. Frequentemente, o AOC constitui somente uma fração (0,1 a 9%) do TOC¹⁹.

- **Contaminação microbiológica:** a água contém grande quantidade de microrganismos que podem se aderir nos recipientes de estocagem e resinas de troca iônica ou carvão ativado, tornando difícil sua remoção e levando à contaminação da água.

Existem vários métodos de purificação para remover um ou mais tipos de impurezas nas águas destinadas ao laboratório clínico. Porém, não existe um único que seja capaz de remover todos os tipos de contaminantes. Por isso, é necessário recorrer a uma combinação de métodos para obter uma água com a qualidade requerida para a sua utilização. Na primeira etapa de purificação a água de alimentação deve passar por diversos estágios de pré-tratamento, para em seguida, passar pelo sistema de tratamento final, o que poderá garantir a integridade dos equipamentos e filtros, aumentando a vida útil dos mesmos^{2,3}. O pré-tratamento tem por objetivo a remoção do material particulado grosso em suspensão presente na água de alimentação. Os métodos existentes para o pré-tratamento são^{1,4}:

- **Filtro de celulose:** utilizado com o objetivo de remover partículas suspensas e microrganismos. O tamanho das partículas removidas vai depender do diâmetro dos poros do filtro escolhido.

- **Filtro de carvão ativado:** utilizado para a remoção de resíduos de desinfetantes como o cloro ou hipoclorito que estão presentes na água de alimentação, além de contaminantes orgânicos dissolvidos, como produtos da degradação de vegetais.

- **Ultrafiltração:** processo mecânico ou eletro-mecânico que remove pequenas impurezas dissolvidas ou suspensas na água. Este método retém as partículas baseado no seu tamanho, forma e carga elétrica e é utilizado em combinação com outros processos de purificação. São utilizados para prevenir a degradação das membranas de osmose reversa e filtros intermediários para remoção de endotoxinas e material particulado.

Depois que a água de alimentação passa pelo pré-tratamento, ela já se encontra livre de alguns contaminantes que poderiam prejudicar o funcionamento adequado do sistema de tratamento, prejudicando a qualidade final da água requerida, passando então para o sistema de purificação. Dentre os métodos existentes para purificação, os mais utilizados nos laboratórios clínicos são^{6,10}:

- **Osmose reversa:** consiste em um sistema que requer uma bomba de alta pressão para forçar a passagem da água por uma membrana semi-permeável que irá reter as impurezas e permitir a passagem da água pura. É utilizada para a remoção de substâncias orgânicas, bactérias e endotoxinas. É um dos sistemas que pode produzir água tipo I se associada a outros sistemas de tratamento.

- **Deionização:** utiliza colunas contendo resinas de troca iônica (aniônica e catiônica) que trocam a resina do leito por compostos inorgânicos dissolvidos na água. Existem dois tipos de deionizadores: a) com leito duplo: a água passa primeiro por um leito de resina de troca catiônica e depois por um leito de resina aniônica; b) leito misto: as resinas aniônicas e catiônicas estão no mesmo leito, mas por apresentarem densidades diferentes se estratificam após ser feita a retrolavagem. O leito misto apresenta desvantagens em relação ao duplo pela dificuldade na regeneração das resinas.

• **Destilação:** baseia-se no princípio da mudança de fases. A água é aquecida em uma coluna de evaporação, passando ao estado de vapor e liberando a maior parte de seus contaminantes. O vapor puro passa por um condensador resfriado e o vapor condensado é então coletado e estocado, transformando-se em uma água mais pura que a original. Produz água purificada, com a remoção de partículas e bactérias, porém não remove substâncias inorgânicas. Pode produzir água tipo I apenas se associado a outros sistemas de tratamento.

Cada processo de purificação apresenta capacidade para remoção de determinados contaminantes com maior ou menor eficiência^{6,16} (Tabela-2).

TABELA II
Comparação da capacidade dos processos de purificação de água.

Métodos	Sólidos	Gases	Contaminantes			
			Substâncias orgânicas	Partículas	Bactérias	Endotoxinas
Destilação	E	R	B	E	E	E
Deionização	E	R	R	R	R	R
Osmose reversa	B	R	B	E	E	E
Carvão ativado	R	R	B	R	R	R
Filtração	R	R	R	E	E	R
Ultrafiltração	R	R	R	E	E	E

E = Excelente (capacidade de remoção completa ou próxima do total)

B = Boa (capacidade de remoção de larga porcentagem)

R = Ruim (capacidade de remoção pequena ou incapaz de remover)

Para o armazenamento da água, muitos laboratórios clínicos utilizam recipientes de vidro ou barriletes de PVC¹⁶. Porém, poucos laboratórios possuem regras escritas para a rotina de limpeza e desinfecção desses recipientes, o que propicia a contaminação da água e formação de biofilmes nas paredes internas dos mesmos. É importante a escolha do material do recipiente, que deve ser inerte, uma vez que alguns componentes presentes na água podem reagir com o material do recipiente comprometendo a qualidade da água produzida e estocada. Além disso, não existe um padrão que determine a validade da água, sendo que cada laboratório estipula a sua variando conforme sua demanda^{5,16,17}.

O controle de qualidade é um requisito importante que consta nas normas referentes às Boas Práticas de Laboratório e indispensável a todos os insumos e reagentes que são utilizados em ensaios *in vitro*. A água é um reagente utilizado em várias técnicas laboratoriais e por isso se faz necessário o seu controle, já que a qualidade desta pode interferir nos resultados^{6,8,16}.

O reconhecimento da ubiquidade dos biofilmes por microbiologistas clínicos e de saúde pública ajudou a reconhecimento de que numerosas doenças infecciosas, como a fibrose cística, estão relacionadas com biofilmes, com o crescimento de biofilmes podendo ocorrer associado a tecidos vivos^{7,11,12}. Algumas infecções causadas pela utilização de dispositivos médicos em ambientes clínicos, como cateteres, estão de igual modo relacionadas com biofilmes. Microrganismos da pele desenvolvem biofilmes em tais materiais plásticos que, deste modo, se tornam um ponto de entrada para o microrganismo^{14,13}. A matriz de polímeros extracelulares que mantém o biofilme coeso é possivelmente também responsável pela persistência das infecções relacionadas com biofilmes e pode até proteger os microrganismos de antibióticos, já que estudos experimentais *in vitro* revelam que células bacterianas em biofilmes são mais resistentes a antibióticos do que células da mesma espécie no estado individualizado e não aderido a biofilmes^{2,3,10}.

O crescimento não desejado de biofilmes tem um impacto negativo também em várias atividades laboratoriais. Degradação de equipamentos através da biocorrosão causada

pelo acúmulo de biofilmes, contaminação de produtos e perdas de pressão são alguns dos efeitos adversos da acumulação de biofilmes microbianos nos sistemas de tratamento e purificação de água nos laboratórios clínicos^{6,9,16}. Tais problemas são agravados pela resistência a métodos de desinfecção e limpeza que os biofilmes demonstram, comparando com células bacterianas livres, uma vez que os métodos convencionais de desinfecção não são suficientes e requerem por vezes doses elevadas de desinfetante, indesejadas de um ponto de vista analítico, pois geralmente sobram resíduos destes na água produzida^{6,8,12}.

A maior parte da atividade bacteriana em ecossistemas aquáticos ocorre não com as células individualizadas, mas com as bactérias organizadas em comunidades sob a forma de um biofilme¹. Esses biofilmes são constituídos por uma comunidade estruturada de células aderentes a uma superfície inerte (abiótica) ou viva (biótica), embebidas numa matriz de exopolissacrídeo⁷. A associação dos organismos em biofilmes constitui uma forma de proteção ao seu desenvolvimento, fomentando relações simbióticas e permitindo a sobrevivência em ambientes hostis^{9,11}.

Apesar da ubiquidade dos biofilmes ser geralmente associada aos finos filmes microbianos que prontamente se formam na maior parte das superfícies sólidas, com espessuras da ordem dos milímetros ou mesmo micrômetros, a espessura de alguns biofilmes pode atingir vários centímetros⁶.

O padrão de desenvolvimento de um biofilme envolve várias etapas: a adesão inicial à superfície, seguida da formação de microcolônias e, na maioria dos casos, a diferenciação das microcolônias em macrocolônias envolvidas numa matriz de exopolissacrídeo, formando biofilmes maduros⁴. A adesão de uma bactéria a uma superfície abiótica é geralmente mediada por interações inespecíficas (ex: forças hidrofóbicas), enquanto que a adesão a um tecido vivo ou desvitalizado é normalmente mediada por mecanismos moleculares específicos de "ancoragem", nomeadamente através de lectinas ou adesinas¹⁷. A adesão primária de um organismo a uma superfície é um processo reversível que envolve a aproximação deste à superfície de forma aleatória ou através de mecanismos de quimiotaxia e de mobilidade¹². Quando o microrganismo atinge uma proximidade crítica da superfície, a ocorrência de adesão depende do balanço final entre forças atrativas e repulsivas (ex: interações eletrostáticas e hidrofóbicas, forças de Van der Waals, impedimento estereoquímico, etc) geradas entre as duas superfícies. A repulsão entre duas superfícies pode ser ultrapassada através de interações moleculares específicas mediadas por adesinas, que são proteínas localizadas em estruturas que irradiam da superfície celular⁸. Foi ainda demonstrado que os mecanismos de mobilidade das células, dependentes de pili superficiais e dos flagelos polares são fundamentais no processo de iniciação de um biofilme¹³.

Após a adesão primária, as células fracamente ligadas consolidam o processo de adesão produzindo exopolissacrídeos que complexam os materiais da superfície e os receptores específicos localizados nos flagelos, pili ou fímbrias. Na ausência de interferência mecânica ou química, a adesão torna-se, nesta fase, irreversível. Durante este estágio de adesão, os microrganismos individualizados ou planctônicos podem "colar-se" uns aos outros, formando agregados na superfície a que aderem. Após a adesão irreversível da bactéria à superfície, inicia-se o processo de maturação do biofilme^{10,12}. A densidade e complexidade do biofilme aumenta à medida que as células se dividem (ou morrem) e os componentes extracelulares gerados pelas bactérias in-

teragem com moléculas orgânicas e inorgânicas do ambiente circundante para formar o glicocálice. Nesta fase, os biofilmes tornam-se altamente hidratados, formando-se estruturas abertas compostas por 73 a 98% de material não celular, incluindo exopolissacrídeo e canais por onde circulam os nutrientes^{5,8}.

O crescimento de qualquer biofilme é limitado pela disponibilidade de nutrientes no ambiente circundante e pela sua propagação à células localizadas no interior do biofilme. Fatores como o pH, difusão de oxigênio, fontes de carbono e osmolaridade controlam também a maturação do biofilme³. Quando completamente maduro, o biofilme funciona como um consórcio funcional de células, com padrões de crescimento alterados, cooperação fisiológica e eficiência metabólica¹.

Quando o biofilme atinge uma determinada massa crítica e o equilíbrio dinâmico é alcançado, as camadas mais externas começam libertar células em estado planctônico, que podem rapidamente se dispersar e multiplicar, colonizando novas superfícies e organizando novos biofilmes em novos locais. Com a ausência de nutrientes e/ou de oxigênio ou dificuldades na sua difusão, a diminuição do pH e a acumulação de metabólitos secundários tóxicos, inicia-se um processo de morte celular³.

Embora alguns estudos tenham sido publicados correlacionando principalmente contagens de bactérias heterotróficas, coliformes e parâmetros físico-químicos à qualidade das águas reagentes para laboratórios clínicos^{6,10,11}, nenhum estudo foi ainda conduzido no Brasil identificando os gêneros e espécies encontrados nos sistemas de purificação e nos biofilmes formados utilizando, além dos métodos de cultivo tradicionais, outros de biologia molecular e microscopia eletrônica. Até o momento, a microbiota encontrada em água reagentes e biofilmes em sistemas de purificação de laboratórios clínicos tem se limitado aos métodos de cultivo. Entretanto, os métodos de cultivo tradicionais não geram um perfil representativo da real composição das comunidades microbianas nestes locais^{4,7,8}. Quando os microrganismos dos ambientes aquáticos oligotróficos como os filtros de carvão ativado são examinados usando sondas de oligonucleotídeos fluorescentes combinadas com microscopia epifluorescente, a maioria dos microrganismos parecem ser metabolicamente ativos¹⁵. Uma segunda técnica independente de cultivo envolve a amplificação e análise das sequências de rDNA 16S^{4,9}. Este método está se tornando extremamente popular para caracterizar novas comunidades microbianas em ambientes aquáticos. Por conta disso, as técnicas cultivo-independentes conseguem detectar comunidades microbianas mais complexas e com maior poder de discriminação entre os gêneros e espécies relacionados aos biofilmes^{14,18}.

OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram quantificar a microbiota heterotrófica total da água após a passagem pelos filtros de carvão ativado e examinar e caracterizar as comunidades microbianas nos biofilmes formados nestes filtros em 8 laboratórios de análises clínicas do Estado do Espírito Santo usando uma combinação de metodologias de cultivo, biologia molecular e microscopia eletrônica. Este estudo documenta a primeira análise de biofilmes em água reagentes de laboratórios clínicos feita no Brasil, usando métodos de sequenciamento de rDNA 16S e microscopia eletrônica.

MATERIAL E MÉTODOS

Laboratórios: Oito laboratórios de análises clínicas situados no Estado do Espírito Santo foram contactados e autorizaram a realização de análises em seus sistemas de produção de água reagentes. Todos os laboratórios possuem sistemas semelhantes e a obtenção da água reagentes obedece basicamente à seguinte sequência: água de alimentação → pré-filtro de 5 µm → filtro de carvão ativado → filtro de 1 µm → deionizador → estoque (barrilete de vidro ou PVC).

Coleta de amostras: Amostras de água (em quantidades de 300 mL) foram obtidas de 8 sistemas de purificação de água, uma amostra de cada laboratório clínico analisado. Solução a 10% (p/v) de tiosulfato de sódio foi adicionada em frascos de polipropileno e esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos com a finalidade de se obter uma concentração de 10 mg/100 mL de amostra para a neutralização do cloro residual. O procedimento de amostragem foi realizado da seguinte forma: pela manhã, após o sistema de purificação ter ficado desligado durante uma noite, o sistema foi ligado e as amostras foram obtidas no tempo zero e após 30 minutos, 2, 4, 6 e 8 horas de funcionamento normal do sistema. Após 8 horas de operação, os sistemas foram desligados e novas amostras foram novamente coletadas no dia seguinte, obedecendo à mesma sequência. As amostras foram coletadas durante 3 dias consecutivos. Paralelamente, uma amostra de água produzida pelo sistema de osmose reversa instalado em nosso laboratório foi coletada para servir como padrão de referência. Este equipamento teve seus cartuchos e membranas trocadas 8 semanas antes do início das análises e todos os ensaios realizados na água produzida por este sistema mostraram resultados abaixo dos limites máximos permitidos para água grau reagentes tipo I.

Processamento das amostras: Diluições seriadas foram realizadas em todas as amostras transferindo-se 10 mL da amostra de água para um Erlenmeyer contendo 90 mL de tampão fosfato pH 7,2 estéril².

Pesquisa de bactérias heterotróficas: As bactérias heterotróficas foram cultivadas após a filtração de 100 mL da amostra diluída em membrana de éster de celulose de 0,45 µm (Millipore®). A membrana foi transferida assepticamente para uma placa de Petri de 60 mm contendo ágar Plate Count contendo o corante cloreto de 2,3,5 trifenil-tetrazólio e incubadas a 20 °C durante 7 dias. As colônias de bactérias foram enumeradas e reportadas como unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro de amostra². As bactérias isoladas foram identificadas utilizando provas bioquímicas convencionais. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

Isolamento de microrganismos dos biofilmes: Swabs estéreis com ponta de algodão foram friccionados durante 30 segundos contra as paredes internas dos filtros de carvão ativado (porções superior e inferior). Um swab foi usado para a microscopia eletrônica e os outros foram suspensos em solução tampão estéril (água peptonada 0,1% tamponada) perfazendo diluições seriadas 1:10, semeando-se 100 µL destas diluições em placas de Petri contendo ágar R2A estéreis com incubação a 20 °C durante 7 dias². As colônias de bactérias foram enumeradas e reportadas como UFC por mililitro de amostra. As bactérias isoladas foram identificadas utilizando provas bioquímicas convencionais. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

Contagem de microrganismos em filtros de carvão ativado sem uso: A técnica do número mais provável (NMP)² foi usada para determinar a contagem total de microrganismos. Suspensões iniciais foram preparadas com 10 g de carvão ativado retirados assepticamente do interior de filtros sem uso, adquiridos comercialmente e do mesmo formato daqueles utilizados nos laboratórios clínicos. Esta massa foi adicionada a um Erlenmeyer contendo 90 mL de tampão fosfato pH 7,2 estéril. Placas de Petri contendo ágar tríptico de soja e ágar tríptico de soja com 5% de sangue desfibrinado de carneiro foram inoculadas com os tubos positivos da técnica do NMP. Os microrganismos foram identificados utilizando provas bioquímicas convencionais. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

Determinação do carbono orgânico total e carbono orgânico assimilável: O TOC foi analisado com o analisador eletrônico Photochem Organic Carbon (Sybron Corp., USA). O método para a adeterminação do AOC consiste na coleta das amostras em frascos de vidro estéreis de 250 mL. As amostras foram então tratadas (100 °C por 5 minutos) para matar as células vegetativas e eliminar possíveis resíduos de desinfetantes. Após o resfriamento, as amostras foram inoculadas com uma suspensão de *Pseudomonas fluorescens* P-17 e incubadas a 20-22 °C por 5 dias. Os frascos foram sonicados em um banho-maria ultrassônico (Branson Cleaning Equipment, Corp., USA) por 5 minutos antes da contagem bacteriana em ágar R2A. Os valores de AOC foram calculados como acetato de carbono equivalente de acordo com os fatores de campo considerados, e acordo com a metodologia descrita por Van der Kooij *et al.*¹⁹ Todas as determinações foram realizadas em duplicata.

Análise com microscopia eletrônica: Cerca de 5g de carvão ativado foram retirados das porções inferior, superior e do meio de cada filtro. Swabs estéreis com ponta de algodão foram friccionados durante 30 segundos contra as paredes internas dos filtros de carvão ativado (porções superior e inferior). Estas amostras foram colocadas em solução contendo 0,1% de glutaraldeído e tampão Tris 0,2 M pH 7,0 (Sigma-Aldrich, USA) a 4 °C. A solução fixadora foi lavada duas vezes com solução tampão Tris 0,2 M (pH 7,0), seguido pela concentração do soluto com etanol (30 a 100%). As amostras foram então secas durante 18 horas em hexametildisilazane [HMDS]^{8,10} (Sigma-Aldrich, USA). No dia seguinte os espécimes foram montados em lâminas de alumínio cobertas com mistura de ouro e paládio e examinadas utilizando um microscópio eletrônico (Jeol Corp., USA, modelo 4000).

Microscopia de fluorescência: 100 µL das soluções preparadas para a microscopia eletrônica foram coradas com acridina-orange 0,1% (Sigma-Aldrich, USA), lavadas duas vezes com água destilada estéril e então montadas em lâminas de microscopia novas e desengorduradas^{10,14}. A estrutura dos biofilmes foi examinada com um microscópio de fluorescência (Nikon E-600).

Extração do DNA contido nos biofilmes: Os ácidos nucléicos das comunidades dos biofilmes foram extraídos através da ruptura física das células com pérolas de vidro¹³. Aproximadamente 200 µL da amostra com biofilme foi suspensa em 1 mL de tampão de lise (Tris pH 8,0 200 mM, EDTA 50 mM, NaCl 200mM, citrato de sódio 2 mM e cloreto de cálcio 10 mM) contendo 20 mg de lisozima por mL (Sigma-Aldrich, USA). As amostras foram incubadas a 37 °C por 1 h com agitação periódica. Proteinase K [1 mg/mL] e dode-

cil sulfato de sódio [0,3%] (Sigma-Aldrich, USA) foram então adicionados e a mistura foi incubada por mais 30 minutos a 70 °C. As amostras foram centrifugadas a baixa rotação em microcentrífuga por 2 minutos na presença de 3% (p/v) de dodecil sulfato de sódio e 0,5 g de pellets de zircônio com cerca de 0,1 mm de diâmetro^{13,18} (Biospec Products Inc., USA). O lisado foi então tratado com RNase (Sigma-Aldrich, USA) por 20 minutos a 37 °C. As proteínas foram precipitadas a partir de 200 µL da fase aquosa da solução com 200 µL de isopropanol. O pellet de DNA foi lavado com etanol 70% e suspenso em uma solução de 50 µL de 10 mM de Tris e 1 mM de EDTA pH 8,0.

Construção das informações de rDNA 16S: rDNA foram amplificados por PCR a partir de 30 ng de DNA-estoque de cada uma das 8 amostras de biofilme coletadas. Os primers 533F (5'-AGAGTTTGATC/TA/CTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-CGGC/TTACCTTGTTACGAC-3') foram usados para amplificar a região 950-bp do DNA 16S. O produto amplificado do PCR foi retirado do gel e purificado de acordo com as instruções do fabricante (Promega, USA). Os recombinantes foram selecionados com os indicadores X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galactopiranosídeo) + IPTG (isopropil-b-D-tiogalactopiranosídeo) em placas de Petri com ágar Luria-Bertani suplementadas com 100 µg de ampicilina por mL^{15,18}. Uma biblioteca de clones foi criada para cada amostra de biofilme processada e os resultados foram agrupados em pool⁹.

Determinação das sequências de nucleotídeos: Os primers M13F e M13R correspondendo ao DNA vetor inserido (Invitrogen, USA) foram usados em reações de amplificação para gerar 165 subclones. Os produtos do PCR foram purificados por filtração¹⁴ (PCR Purification Kit, Millipore, USA) e sequenciado bidirecionalmente com primers de oligonucleotídeos universais 533F e 1492R. Os produtos foram separados em um sequenciador (ABI Systems, USA).

Análise estatística: Comparações estatísticas foram realizadas com os dados transformados em logaritmos de acordo com o teste t pareado¹⁷. Modelos de regressão e coeficientes de correlação foram determinados com o auxílio dos softwares estatísticos Stat-Pac versão 2.5 e SPSS versão 3.0.

RESULTADOS

Os resultados da contagem de colônias dos filtros de carvão ativado sem uso, são mostrados na Tabela-3. Nenhuma bactéria Gram-negativa foi isolada em qualquer dos filtros sem uso examinados. Somente cocos Gram-positivos e bacilos Gram-positivos esporulados foram isolados dos filtros examinados nessa fase do estudo.

TABELA III
Avaliação da quantidade e tipos de microrganismos presentes nos filtros de carvão ativado sem uso.

Filtros ^a	Microrganismos isolados	UFC ^b /g
1	<i>Bacillus</i> spp., <i>Micrococcus</i> spp.	< 0,3
2	<i>Bacillus</i> spp.	< 0,3
3	<i>Bacillus</i> spp., <i>Micrococcus</i> spp.	< 0,3
4	<i>Bacillus</i> spp.	< 0,03
5	<i>Bacillus</i> spp.	< 0,3
6	<i>Bacillus</i> spp.	< 0,3
7	<i>Bacillus</i> spp.	< 0,03
8	<i>Bacillus</i> spp., <i>Micrococcus</i> spp.	< 0,3
9	<i>Bacillus</i> spp., <i>Micrococcus</i> spp.	< 0,3
10	<i>Bacillus</i> spp., <i>Micrococcus</i> spp.	< 0,3

^a Todos os filtros foram fabricados menos de 5 meses antes das análises serem realizadas
^b UFC, Unidade Formadora de Colônia

TABELA IV
Contagens de bactérias heterotróficas cultiváveis
nas amostras de água coletadas dos filtros de
carvão ativado.

Laboratório Nº	Tempo	UFC/mL de água		
		Dia 1	Dia 2	Dia 3
1	0	7,1 x 10 ²	3,0 x 10 ³	2,5 x 10 ³
	30 minutos	5,5 x 10 ²	3,1 x 10 ³	2,3 x 10 ³
	2 horas	2,3 x 10 ²	8,8 x 10 ²	4,5 x 10 ²
	4 horas	1,4 x 10 ²	8,4 x 10 ²	6,8 x 10 ¹
	6 horas	1,0 x 10 ²	5,1 x 10 ¹	3,1 x 10 ¹
	8 horas	5,5 x 10 ¹	1,6 x 10 ¹	1,2 x 10 ¹
2	0	3,0 x 10 ³	3,2 x 10 ³	3,0 x 10 ³
	30 minutos	9,1 x 10 ²	3,0 x 10 ³	2,4 x 10 ³
	2 horas	7,2 x 10 ²	4,7 x 10 ²	1,1 x 10 ³
	4 horas	5,0 x 10 ²	4,0 x 10 ²	5,7 x 10 ²
	6 horas	4,1 x 10 ²	5,9 x 10 ¹	2,3 x 10 ²
	8 horas	3,0 x 10 ²	4,3 x 10 ¹	1,6 x 10 ²
3	0	4,5 x 10 ⁴	4,0 x 10 ⁴	7,1 x 10 ³
	30 minutos	4,1 x 10 ⁴	3,4 x 10 ⁴	5,3 x 10 ³
	2 horas	3,0 x 10 ⁴	8,1 x 10 ³	5,0 x 10 ³
	4 horas	4,9 x 10 ³	5,0 x 10 ³	7,4 x 10 ²
	6 horas	1,1 x 10 ³	4,2 x 10 ²	7,0 x 10 ²
	8 horas	8,2 x 10 ²	3,6 x 10 ³	5,3 x 10 ²
4	0	4,0 x 10 ⁴	3,4 x 10 ⁴	4,1 x 10 ⁴
	30 minutos	3,1 x 10 ⁴	2,9 x 10 ⁴	1,4 x 10 ⁴
	2 horas	8,1 x 10 ³	5,8 x 10 ³	8,0 x 10 ³
	4 horas	5,4 x 10 ³	5,1 x 10 ³	7,1 x 10 ³
	6 horas	1,1 x 10 ³	3,5 x 10 ²	5,2 x 10 ²
	8 horas	6,9 x 10 ²	2,1 x 10 ²	4,0 x 10 ²
5	0	3,9 x 10 ³	2,4 x 10 ⁴	2,3 x 10 ⁴
	30 minutos	3,0 x 10 ³	1,8 x 10 ⁴	1,1 x 10 ⁴
	2 horas	2,1 x 10 ³	9,0 x 10 ³	7,4 x 10 ³
	4 horas	6,4 x 10 ²	6,4 x 10 ³	2,9 x 10 ³
	6 horas	1,1 x 10 ²	6,9 x 10 ²	8,6 x 10 ²
	8 horas	5,0 x 10 ¹	2,0 x 10 ²	5,5 x 10 ²
6	0	5,6 x 10 ³	3,9 x 10 ³	4,1 x 10 ³
	30 minutos	1,2 x 10 ³	2,2 x 10 ³	3,6 x 10 ³
	2 horas	4,6 x 10 ²	1,0 x 10 ³	9,0 x 10 ²
	4 horas	1,4 x 10 ²	7,6 x 10 ²	5,7 x 10 ²
	6 horas	1,0 x 10 ²	5,3 x 10 ²	1,8 x 10 ²
	8 horas	4,0 x 10 ¹	1,9 x 10 ²	7,8 x 10 ¹
7	0	3,8 x 10 ⁴	3,0 x 10 ⁴	3,2 x 10 ⁴
	30 minutos	3,0 x 10 ⁴	2,4 x 10 ⁴	1,0 x 10 ⁴
	2 horas	2,1 x 10 ⁴	1,4 x 10 ⁴	5,4 x 10 ³
	4 horas	8,4 x 10 ³	5,5 x 10 ³	2,1 x 10 ³
	6 horas	5,9 x 10 ³	5,1 x 10 ³	1,0 x 10 ³
	8 horas	5,2 x 10 ³	4,0 x 10 ³	6,6 x 10 ²
8	0	2,9 x 10 ³	3,6 x 10 ³	3,1 x 10 ³
	30 minutos	1,0 x 10 ³	2,0 x 10 ³	2,5 x 10 ³
	2 horas	6,4 x 10 ²	7,2 x 10 ²	1,2 x 10 ³
	4 horas	2,3 x 10 ²	5,4 x 10 ²	8,4 x 10 ²
	6 horas	4,6 x 10 ¹	1,1 x 10 ²	4,6 x 10 ²
	8 horas	2,0 x 10 ¹	6,3 x 10 ¹	3,2 x 10 ²

A Tabela-4 mostra as contagens de bactérias heterotróficas cultiváveis nos 8 laboratórios clínicos analisados. As amostras coletadas pela manhã, antes do início das atividades laboratoriais, tiveram contagens de bactérias heterotróficas variando de 2,3 x 10³ a 4,5 x 10⁴ UFC/mL e aquelas coletadas após 8 horas de utilização do sistema, evidenciaram contagens variando de 1,2 x 10¹ a 5,2 x 10³ UFC/mL (Tabela-4). Esses valores estão de acordo com vários estudos publicados^{1,7,10,11}, demonstrando o aumento da população microbiana após o período de 10 a 12 horas de interrupção do sistema de purificação e diminuição destas contagens ao fim das atividades do laboratório. A identificação das bactérias heterotróficas isoladas mostrou que a maioria destas bactérias pertencem à família Pseudomonadaceae. *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* e *Acinetobacter baumannii* foram os microrganismos cultiváveis predominantes encontrados na água após a passagem pelo sistema de purificação dos laboratórios. Espécies cultiváveis menos predominantes isoladas nessas amostras foram identificadas principalmente através da metodologia molecular. As análises de TOC e AOC mostraram um padrão cíclico, com os mais altos valores sendo encontrados pela manhã,

antes do início das atividades do sistema. Valores de até 3,4 mg/L e 255,0 µg/L de TOC e AOC foram encontrados em alguns laboratórios, respectivamente (Tabela-5). Os dados demonstram a correlação entre os altos índices de TOC e AOC e altas contagens de bactérias heterotróficas nas amostras de água, demonstrando que as maiores contagens foram obtidas quando eram encontrados valores de 0,7 mg/L e 73 µg/L de TOC e AOC, respectivamente. Esta quantidade de carbono disponível pode prover nutrientes suficientes para suportar o crescimento de 3,5 x 10⁵ bactérias por mL de água (baseado nos critérios de Van der Kooij *et al.* 19 de 7 x 10⁻⁵ g de carbono por litro dividido por 10-13 g de carbono por célula e 50% de assimilação). As diferenças entre os níveis de AOC antes do início das atividades e no final do dia de trabalho variaram mais de 100% em algumas amostras, com resultados menores sendo encontrados ao final do dia, o que pode ser explicado pelo fato de que, uma vez que o AOC entra no sistema, ele é rapidamente consumido pelos microrganismos presentes nos biofilmes, correspondendo ao que foi descrito por Le-Chevallier *et al.*¹⁴

TABELA V
Valores de TOC e AOC nas amostras de água dos
filtros de carvão ativado.

Laboratório Nº	Tempo	TOC (mg/L)	AOC (µg/L)
1	0	1,1	88,1
	8 horas	0,2	12,0
2	0	2,4	168,2
	8 horas	1,8	56,7
3	0	3,0	150,4
	8 horas	1,4	96,3
4	0	3,2	214,0
	8 horas	0,9	102,9
5	0	3,1	201,3
	8 horas	2,7	142,7
6	0	1,9	52,4
	8 horas	0,8	10,1
7	0	3,4	255,0
	8 horas	1,0	201,7
8	0	2,3	159,8
	8 horas	1,1	82,4

As análises com microscopia eletrônica, obtidas dos biofilmes coletados nos filtros de carvão ativado, revelaram uma densa matriz de exopolissacarídeo. Bactérias de distintos morfotipos (cocos, bacilos e bactérias filamentosas) puderam ser observadas nas matrizes, revelando a complexidade dos biofilmes formados. Esta densa matriz também foi revelada pela coloração fluorescente usando acridina-orange. Além disso, foram visualizadas células largas, aparentemente de organismos unicelulares eucariontes em alguns biofilmes analisados.

Vinte e um gêneros bacterianos foram identificados entre as sequências de 165 subclones de genes rDNA 16S amplificados a partir do DNA genômico dos biofilmes encontrados nos filtros de carvão ativado. Na análise molecular, todas as bactérias encontradas nos biofilmes puderam ser identificadas (Tabela-6), ao passo que somente 68% delas foram cultiváveis pelos métodos microbiológicos tradicionais.

TABELA VI
Bactérias nas amostras de biofilmes identificados pelo sequenciamento rDNA 16S.

Laboratório N°	Bactérias identificadas (%) ^a
1	<i>Afipia</i> spp. (28%), <i>Paracoccus solventivorans</i> (20%), <i>Staphylococcus epidermidis</i> (19%), <i>Acinetobacter baumannii</i> (17%), <i>Sphingomonas paucimobilis</i> (12%), <i>Mesorhizobium</i> spp. (4%), OE ^b
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (63%), <i>Sphingomonas alaskaensis</i> (16%), <i>Afipia</i> spp. (8%), <i>Paracraurococcus</i> spp. (6%), <i>Rhizobium</i> spp. (3%), <i>Staphylococcus warneri</i> (2%), <i>Caulobacter leidyi</i> (2%)
3	<i>Acinetobacter baumannii</i> (48%), <i>Sphingomonas paucimobilis</i> (27%), <i>Pseudomonas putida</i> (21%), <i>Staphylococcus pasteurii</i> (4%)
4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (59%), <i>Pseudomonas stutzeri</i> (18%), <i>Afipia</i> spp. (10%), <i>Paracoccus solventivorans</i> (10%), <i>Staphylococcus epidermidis</i> (8%), <i>Acinetobacter baumannii</i> (1%), <i>Sphingomonas paucimobilis</i> (1%), OE
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (49%), <i>Corynebacterium tuberculostearicum</i> (18%), <i>Flexibacter</i> spp. (9%), <i>Citrobacter freundii</i> (7%), <i>Enterobacter aerogenes</i> (5%), <i>Pseudomonas stutzeri</i> (5%), <i>Staphylococcus warneri</i> (1%)
6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (57%), <i>Serratia fonticola</i> (14%), <i>Rhodothermus</i> spp. (10%), <i>Pseudomonas putida</i> (8%), <i>Sphingomonas yanokuyae</i> (6%), <i>Agrobacterium radiobacter</i> (3%), <i>Odontella</i> spp. (1%), <i>Staphylococcus epidermidis</i> (1%)
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (43%), <i>Acinetobacter baumannii</i> (21%), <i>Geodermatophilus</i> spp. (8%), <i>Mesorhizobium</i> spp. (8%), <i>Pseudomonas putida</i> (7%), <i>Pseudomonas stutzeri</i> (6%), <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (5%), <i>Actinomyces israelii</i> (2%), OE
8	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (49%), <i>Flavobacterium meningosepticum</i> (19%), <i>Pseudomonas vesicularis</i> (15%), <i>Polydora</i> spp. (10%), <i>Rhodothermus</i> spp. (3%), <i>Sphingomonas asaccharolytica</i> (2%), <i>Paracoccus thiocyanatus</i> (2%)



Figura-1. Filtros sem uso para purificação de água em laboratórios clínicos (da esquerda para a direita: filtro de carvão ativado, filtro pleissado 5 µm, filtro pleissado 1 µm).

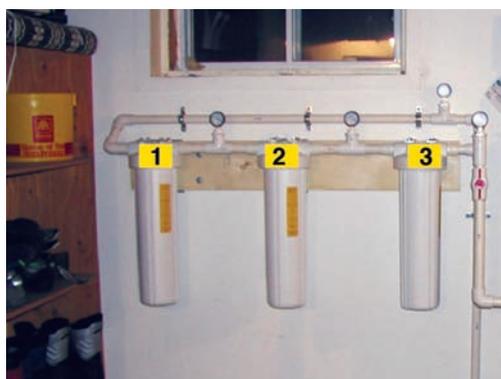


Figura-2. Sistema de purificação de água no laboratório no 8: sequência de pré-filtro de 5 µm (1), filtro de carvão ativado (2) e filtro de 1 µm (3).



Figura-3. Sistema de purificação de água no laboratório no 3: local impróprio e ausência de manutenção preventiva e controle dos filtros.



Figura-4. Filtro de carvão ativado no laboratório no 1: local impróprio e ausência de sistema de pré-filtração.



Figura-5. Filtros de carvão ativado sem biofilme (esquerda) e com biofilme evidente (direita).



Figura-6. Biofilme grosseiro formado em filtro de carvão ativado.

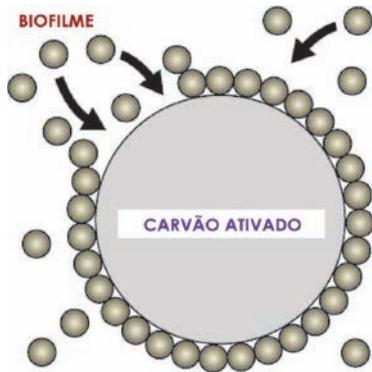


Figura-7. Desenho esquemático demonstrando a adesão do biofilme às partículas de carvão ativado.

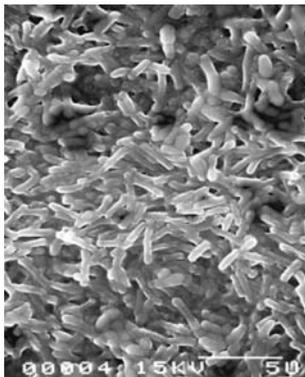


Figura-8. Microfotografia de biofilme formado em filtro de carvão ativado do laboratório no 7: predominância de bacilos em uma matriz de exopolissacarídeo densa e estruturada (8.500x).

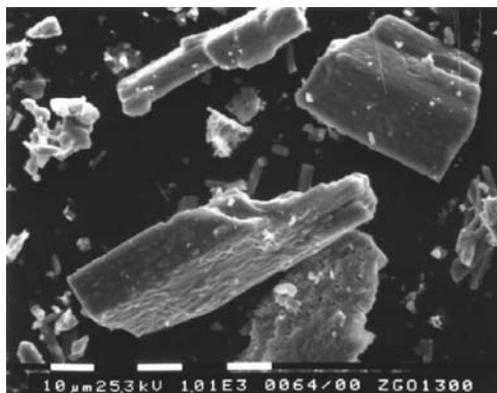


Figura-9. Microfotografia de partículas de carvão ativado em filtro sem uso (7.000x).

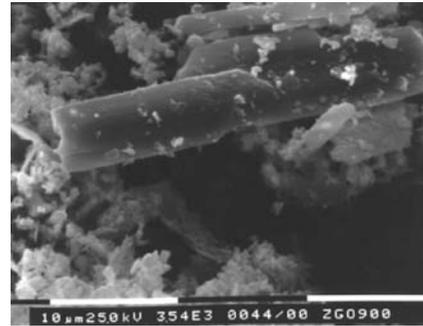


Figura-10. Microfotografia de biofilme formado em partículas de carvão ativado do laboratório no 4: matriz de exopolissacarídeo densa e estruturada evidenciando uma complexa comunidade de cocos e bacilos (7.000x).

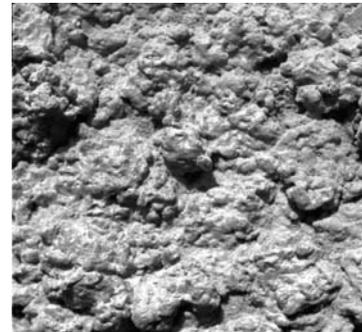


Figura-11. Microfotografia da superfície de cartucho de PVC sem uso: superfície irregular e de fácil adesão microbiana e formação de biofilmes (8.500x).

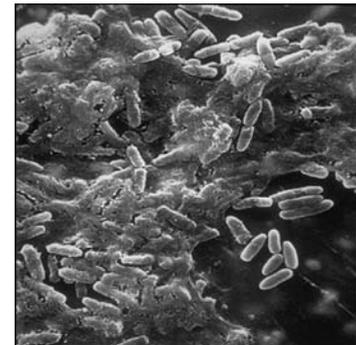


Figura-12. Microfotografia de biofilme formado na superfície de cartucho de PVC onde o filtro de carvão ativado do laboratório no 2 se encontra: predominância de bacilos em uma matriz de exopolissacarídeo densa e estruturada (8.500x).

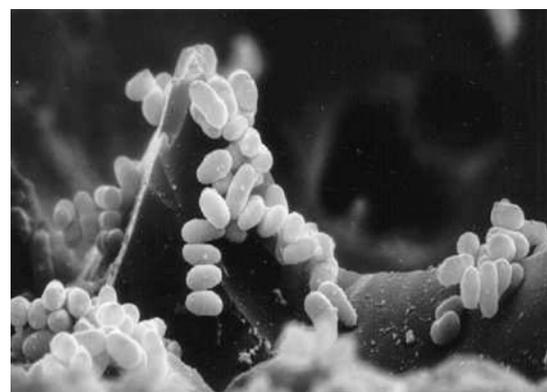


Figura-13. Microfotografia de biofilme formado em partículas de carvão no filtro de carvão ativado do laboratório no 3: predominância de bacilos e cocobacilos (9.000x).



Figura-14. Microfotografia de biofilme formado na superfície interna do filtro de carvão ativado do laboratório no 6: nota-se a cor esverdeada devido à matriz de exopolissacarídeo produzida principalmente por *Pseudomonas aeruginosa* (1.500x).

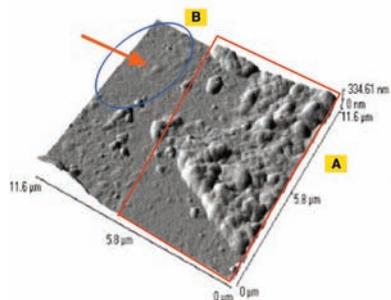


Figura-15. Microfotografia de varredura demonstrando o avanço progressivo do biofilme formado na superfície interna do filtro de carvão ativado do laboratório no 5: presença de biofilme (A) e local ainda sem a presença de biofilme (B) mas já com bactérias aderidas à superfície (seta) (8.000x).

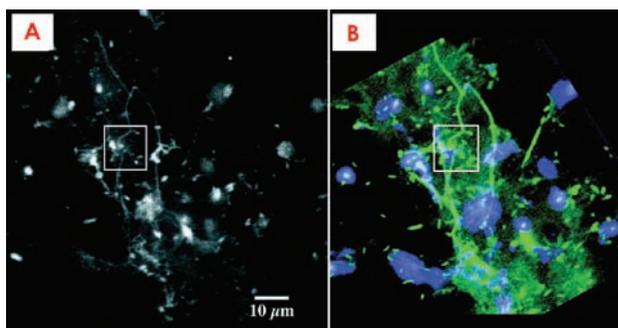


Figura-16. Microfotografia de fluorescência com acridina-orange demonstrando a complexa estrutura do biofilme formado no interior do filtro de carvão ativado do laboratório no 7: lâmina sem coloração (A) e com coloração fluorescente (B). As estruturas azuis são os complexos de exopolissacarídeo. Uma grande variedade de bactérias é evidenciada pela coloração verde (1.200x).

DISCUSSÃO

A edição mais recente do CLSI sobre produção e controle de qualidade da água grau reagente para laboratórios de análises clínicas⁶ inclui importantes informações que atualizam o documento anterior, inserindo novos parâmetros como a mensuração do TOC e dos sólidos totais nestas águas. Ênfase é dada aos parâmetros físico-químicos e microbiológicos como um meio efetivo de controlar a qualidade da água, bem como a importância da validação da água reagente produzida nos laboratórios clínicos. Uma nova seção provê guias para a validação, manutenção e revalidação do sistema de purificação de água. As designações "Tipo I, II e III" para os graus de água purificada usadas nas edições anteriores foram substituídas. O termo "água

reagente para laboratórios clínicos" deve ser usado no lugar de "Tipo I e II" para a maioria das aplicações. Águas de alimentação dos sistemas e águas esterilizadas por autoclavagem podem ser convenientemente designadas "águas Tipo III". A medição da resistividade foi mantida para o monitoramento de impurezas inorgânicas. A edição anterior¹⁶ recomendava que os sistemas de purificação de água incluíssem um estágio para a redução de contaminantes orgânicos mas não requeria nenhum tipo de controle. A edição atual do documento do CLSI reconhece que a contaminação orgânica pode ser difícil de ser eliminada da água de alimentação e deve ser controlada. Para isso, o parâmetro carbono orgânico total (TOC) foi acrescentado. Uma ressalva feita pelo documento é que não se deve fazer as medições de TOC on-line ou in-house e que as amostras devem ser enviadas para um laboratório de controle de qualidade para a medição do TOC em equipamentos específicos. A contagem de bactérias heterotróficas em placas foi mantida no documento atual por se tratar de uma metodologia adaptável praticamente todos os laboratórios clínicos. Entretanto, sugere-se o uso de microscopia de fluorescência e a dosagem de endotoxinas como testes opcionais pois estes geram informações adicionais importantes à qualidade da água reagente. O parâmetro de esterilidade não foi incluído neste último documento do CLSI pois a maioria das aplicações do laboratório clínico não requer água estéril. Quando necessário, a água pode ser esterilizada por autoclavagem.

O uso do carvão ativado para remover eficientemente o gosto e o odor de águas para o consumo humano há mais de 20 anos trouxe outras aplicações para esta substância, incluindo a purificação de água para os laboratórios clínicos e farmacêuticos, em geral na forma de cartuchos e filtros e em conjunto com sistemas de pré-tratamento da água como os filtros plissados de 1, 5 e 10 μm^2 . Outras características destes filtros incluem a remoção de material particulado suspenso na água e a eliminação do cloro residual usado no tratamento convencional da água de abastecimento público através da adsorção das moléculas de cloro pelas partículas de carvão ativado⁷.

Os filtros de carvão ativado sem uso, em geral, não necessitam ser estéreis para serem usados em sistemas de purificação de água para o laboratório clínico. Portanto, uma microbiota transitória composta por bactérias heterotróficas ubíquas pode ser encontrada⁶. Os resultados apresentados neste estudo indicaram que somente alguns bacilos Gram-positivos formadores de esporos e cocos Gram-positivos foram isolados em cultura a partir das partículas de carvão ativado de filtros sem uso. Além disso, não há relatos na literatura da formação de biofilmes pelas bactérias encontradas nestes filtros sem uso (*Bacillus* spp. e *Micrococcus* spp.). Portanto, estas bactérias não possuem um papel significativo na ocorrência de biofilmes em filtros de carvão ativado utilizados em laboratórios clínicos. Nenhuma bactéria Gram-negativa foi detectada nas análises destes filtros sem uso. Além disso, as análises de TOC, AOC e contagem de bactérias heterotróficas estavam dentro dos limites máximos permitidos quando foi analisada a água reagente do nosso laboratório produzida por sistema de purificação sem a presença de biofilmes.

LeChevalier *et al.*¹⁴ demonstraram que o exopolissacarídeo produzido por comunidades encontradas em biofilmes aderidos em partículas de carvão ativado não é eliminado quando exposto a até 2,0 mg/L de cloro livre durante 60 minutos. Segundo a Portaria 518/2004 da ANVISA⁴, o valor mínimo de cloro livre que deve estar presente na água de

abastecimento público é 0,20 mg/L. Dessa forma, segundo vários estudos^{4,9,11,15} pode-se diminuir drasticamente a quantidade de bactérias heterotróficas e eliminar os enteropatógenos mais frequentes nas águas de consumo humano. Como os sistemas de purificação de água dos laboratórios clínicos recebe esse tipo de água clorada, é necessário que se remova esse cloro livre e isso é feito, em geral, utilizando o filtro de carvão ativado. Entretanto, quando o sistema é desligado, a água sem cloro permanece dentro dos cartuchos com os filtros. A presença de bactérias potencialmente capazes de formar exopolissacarídeo neste meio torna-se, então, o passo inicial para a formação de biofilmes¹.

Segundo diversos outros estudos^{3,9,15,19}, a disponibilidade de matéria orgânica (mensurado na forma de TOC e/ou AOC) em sistemas de purificação de água tem um papel extremamente importante no crescimento e manutenção das comunidades microbianas, gerando nutrientes suficientes para a adaptação destes microrganismos ao ambiente onde eles se encontram. Os resultados apresentados neste estudo indicam que o AOC foi consumido ao longo do dia de trabalho e utilizado pelos microrganismos que se encontravam nas matrizes de biofilmes aderidas aos filtros de carvão ativado. Os cálculos realizados mostraram que uma quantidade suficiente de carbono orgânico foi utilizado para suportar o crescimento de até $4,5 \times 10^4$ bactérias por mL de água. Estes resultados estão estreitamente relacionados aos encontrados em vários outros estudos^{2,6,9,17}, indicando que a manutenção preventiva adequada de todo o sistema é crucial para a diminuição do aporte de AOC para os biofilmes. Van der Kooij *et al.*¹⁹ indicaram que o crescimento bacteriano em águas sem cloro livre pode ser limitado sem houver um aporte de menos que 50 µg de AOC por litro de água. Os resultados apresentados em nosso estudo indicaram que níveis de AOC 52,4 µg/L foram suficientes para que houvesse multiplicação microbiana. Os resultados obtidos também evidenciaram que a média de AOC em relação ao TOC foi de 8,9%. Este valor está de acordo com aqueles encontrados por Van der Kooij *et al.* (0,1 a 9,0%)¹⁹.

Altos valores de bactérias heterotróficas totais foram observados em todas as amostras de água coletadas antes do início das atividades dos laboratórios. As bactérias mais comumente encontradas (Pseudomonadaceae) também foram as principais responsáveis pela grande produção de exopolissacarídeos encontrados nas análises dos biofilmes. Em geral estas bactérias são muito resistentes à cloração da água e entram nos sistemas pela água de alimentação. Ao encontrarem ambiente propício para a adesão elas se estabelecem e começam a agregar diversos outros microrganismos na matriz do biofilme^{1,5}. Klausen *et al.*¹³ relataram que as Pseudomonadaceae predominaram nos biofilmes analisados de sistemas de purificação de água em consultórios odontológicos, sendo também capazes de se multiplicar em ambientes com baixa quantidade de nutrientes. O'Toole *et al.*¹⁷ relataram que cerca de 20% das bactérias heterotróficas isoladas em filtros de carvão ativado de farmácias de manipulação pertencem à família Pseudomonadaceae. Estudos realizados pelo CLSI⁶ demonstraram o impacto negativo da presença de subprodutos dos biofilmes nas águas reagentes utilizadas em análises bioquímicas e imunológicas, gerando resultados discrepantes quando comparados com análises realizadas com água reagente produzida por sistemas sem a presença de biofilmes.

Aparentemente, muitos fatores seletivos favorecem a colonização destas bactérias em sistemas de purificação de água e o entendimento destes fatores pode auxiliar no controle dos biofilmes. A predominância de *Pseudomonas aeruginosa* nos biofilmes pode ser consequência da capacidade desta bactéria em se multiplicar mais rapidamente que outras. Também é fato que algumas cepas de *P. aeruginosa* produzem bacteriocinas quando em matrizes de exopolissacarídeos, o que impede a multiplicação de muitas outras bactérias, oferecendo uma grande vantagem na competição por espaço e nutrientes nos biofilmes³.

As análises com microscopia eletrônica e fluorescência com acridina-orange, além das análises moleculares, demonstraram a complexidade das comunidades que coexistem nos biofilmes aderidos aos filtros de carvão ativado. Os resultados obtidos também foram cruciais para revelar toda a microbiota presente nos biofilmes, uma vez que somente 68% destes microrganismos foram cultiváveis através da metodologia tradicional. No Brasil não há relatos de estudos dessa natureza abordando especificamente a água reagente para laboratórios de análises clínicas.

O entendimento da importância dos biofilmes na qualidade da água reagente para laboratórios clínicos pode levar à uma melhor manutenção preventiva dos sistemas de purificação, através da definição de protocolos de análises periódicas e substituição dos filtros de acordo com a demanda de cada laboratório, para evitar o impacto negativo dos biofilmes e de seus subprodutos lançados nas águas reagentes.

REFERÊNCIAS

1. Allison, D.G. The biofilm matrix. *Biofouling* 19:139-150, 2003.
2. American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. American Public Health Association, Washington, DC, 1998.
3. Bollinger, N., Hassett, D.J., Iglewski, B.H., Costerton, J.W. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence of iron override effects on quorum sensing and biofilm-specific gene regulation. *J. Bacteriol.* 183:1990-1996, 2001.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Portaria 518, 2004.
5. Cochran, W.L., Suh, S.J., McFeters, G.A., Stewart, P.S. Role of RpoS and AlgT in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm resistance to hydrogen peroxide and monochloramine. *J. Appl. Microbiol.* 88:546-553, 2000.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. C3-P4 - Preparation and Testing of Reagent Water in the Clinical Laboratory; Proposed Guideline- Fourth Edition, 2005.
7. Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Lappin-Scott, H.M. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49:711-745, 1995.
8. Davey, M.E., O'Toole, G.O. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:847-867, 2000.
9. Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, P.H., Costerton, J.W. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280:295-298, 1998.
10. Friedman, L., Kolter, R. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Mol. Microbiol.* 51:675-690, 2004.
11. Heydorn, A., Ersboll, B.K., Hentzer, M., Parsek, M.R., Molin, S. Experimental reproducibility in flow-chamber biofilms. *Microbiology* 146:2409-2415, 2000.
12. Klausen, M., Aaes-Jorgensen, A., Molin, S., Tolker-Nielsen, T. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol. Microbiol.* 50:61-68, 2003.
13. Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Tolker-Nielsen, T. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol. Microbiol.* 48:1511-1524, 2003.
14. LeChevallier, M.W., Schulz, W., Lee, R.G. Bacterial nutrients in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:857-862, 1991.
15. Matsukawa, M. Putative exopolysaccharide synthesis genes influence *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J. Bacteriol.* 186:4449-4456, 2004.

16. National Committee for Clinical Laboratory Standards. C3-A3 - Preparation & Testing of Reagent Water in the Clinical Laboratory - Third Edition; Approved Guideline, 1997.
17. O'Toole, G.A., Pratt, L.A., Watnick, P.I., Newman, D.K., Kolter, R. Genetic approaches to the study of biofilms. *Methods Enzymol.* 310:91-109, 1999.
18. Southey-Pillig, C.J., Davies, D.G., Sauer, K. Characterization of Temporal Protein Production in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *J. Bacteriol.* 187: 8114-8126, 2005.
19. Van der Kooij, D.; Visser, A.; Hijnen, W.A.M. Determining the concentration of easily assimilable organic carbon in drinking water. *J. Am. Water Works Assoc.* 74:540-545, 1982.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA
Carlos Henrique P. de Menezes e Silva
Rua Búcio Bacelar, 16/803 - Praia da Costa
CEP: 29101-030 - Vila Velha - ES
Tel.: 27 - 3349-9205



Sociedade Brasileira de Análises Clínicas®

**IFCC WORLDLAB
Fortaleza - Brasil**

**20° Congresso Internacional de Bioquímica e Medicina Laboratorial
35° Congresso Brasileiro de Análises Clínicas
8° Congresso Brasileiro de Citologia Clínica**

28 de setembro - 2 outubro/2008

Local:
Centro de Convenções do Ceará

Análise do desempenho da prova de nitritos das tiras reativas de urina para triagem de infecção bacteriana do trato urinário

Analysis of the acting of the test of nitrite of the test strip of urine for screen of the urinary tract bacterial infection

Celina Shizue Yoshida¹, Mary Mayumi Taguti Irie², Rúbia Andréia Falleiros de Pádua², Cinthia Gandolfi Boer³, Vera Lúcia Dias Siqueira⁴ & Marcia Edilaine Lopes Consolaro³

RESUMO - As infecções do trato urinário (ITU) são enfermidades muito freqüentes, a maioria das vezes causadas por bactérias, principalmente bactérias Gram-negativas BGN. As ITU são definidas como um processo infeccioso de qualquer órgão do trato urinário. O método diagnóstico padrão para a detecção de ITU bacteriana é a urocultura, que apresenta várias vantagens, porém possui desvantagens como demora na emissão do diagnóstico e o alto custo. Por isso, têm-se buscado provas mais rápidas, sensíveis e econômicas para a triagem de ITU, que identifiquem os casos negativos e alertem para bactérias significativas. Com este intuito, o presente trabalho objetivou avaliar o desempenho da prova de nitritos das tiras reativas de urina (TRU) para triagem de ITU, através da determinação de sua sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (PPV) e valor preditivo negativo (NPV), tomando como método padrão a urocultura. Foi feito um estudo dos resultados da prova de nitritos e da urocultura de urinas processadas durante o período de janeiro de 1999 a dezembro de 2001 no LEPAC-UEM-PR. Obteve-se os seguintes resultados: sensibilidade 48,33%, especificidade 100,00%, PPV 100,00%, NPV 89,35%, prevalência 18,75%, predição de falso-positivo 0,00%, predição de falso-negativo 10,65%. Desta forma, observou-se que a prova de nitrito pelas TRU apresentou altos valores de especificidade, PPV e NPV, porém a sensibilidade foi relativamente baixa. Isto indica que este método parece não ser um bom screening de ITU e portanto não deve ser utilizado como único teste para diagnóstico desta patologia.

PALAVRAS-CHAVE - infecção urinária, nitrito, tira reativa de urina.

SUMMARY - The urinary tract infection (UTI) are very frequent illnesses, most of the times caused by bacteria, mainly Gram Negative Bacilo (BGN). IUT is defined as an infectious process of any organism of the urinary tract. The method standard diagnosis for the detection of bacterial UTI is the urine culture, that presents several advantages, even so it possesses disadvantages as delay in the emission of the diagnosis and the high cost. That, faster, sensitive and economic tests have been looking for for the screen of UTI, that they identify the negative cases and alert for significant bacteriuria. With this intuito, the present work objectified to evaluate the acting of the test of nitrite of test strip of urine (TSU) for screen of UIT, through the determination of its sensibility, especificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV), taking as standard method the urine culture. It was made a study of the results of the nitrite test and of the urine culture of urines processed during the period of January of 1999 to December of 2001 in LEPAC-UEM-PR. It was obtained the following results: sensibility 48,33%, especificity 100,00%, PPV 100,00%, NPV 89,35%, prevalency 18,75%, prediction of false-positive 0,00%, prediction of false-negative 10,65%. This way, it was observed that the nitrite test for TSU presented high especificity values, PPV and NPV, even so the sensibility was relatively low. This indicates that this method seems not to be a good screening of UIT and therefore it should not be used as only test for diagnosis of this pathology.

KEYWORDS - urinary infection, nitrite, test strip of urine.

INTRODUÇÃO

As infecções do trato urinário (ITU) são uma das enfermidades mais freqüentes nas consultas de ambulatório e no meio hospitalar, existindo possibilidades de agravamento na dependência do estado geral do paciente e da sua idade, entre outras variáveis. Por esta razão, merecem grande atenção nas pesquisas e estudos nas ciências médicas^{6,7,17}.

Infecção urinária pode ser definida como a invasão microbiana de qualquer órgão do trato urinário desde a uretra até os rins¹². A maioria das infecções se restringem à bexiga, sem ascensão de germes para os rins, representando o quadro clássico de ITU¹¹.

As ITU acometem homens e mulheres em qualquer idade, sendo que os grupos mais comprometidos são os seguintes: recém-nascidos do sexo masculino, meninas em idade pré-escolar, mulheres jovens sexualmente ativas, homens com obstrução prostática e idosos de ambos os sexos²⁰.

Os sintomas das ITU são fundamentalmente os mesmos

nos pacientes de qualquer idade. Nos primeiros anos de vida, predominam os sintomas gerais: apatia, perda de peso, deficiência no desenvolvimento, vômitos, diarreia ou constipação intestinal e febre. Nas crianças com mais idade e nos adultos, as ITU agudas caracterizam-se por febre precedida de calafrios e dor lombar associada a polaciúria, disúria, tenesmo vesical, nictúria, náuseas, vômitos e distensão abdominal⁴.

Segundo OLIVEIRA & MARQUES¹⁵, as ITU destacam-se não somente pela sua freqüência como também pela possibilidade de complicações graves, como a insuficiência renal e a septicemia. Clinicamente podem apresentar-se quadros diversos, variando desde as cistites mais simples, até complicações severas e irreversíveis do parênquima renal como as pielonefrites.

Qualquer microrganismo invasor, tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas, vírus, fungos e outros agentes, pode ser a causa das ITU⁵. A etiologia das ITU apresenta variações quanto ao sexo, idade, estado geral do

Recebido em 05/07/2005

Aprovado em 24/04/2006

¹Aluna do curso de Especialização em Biologia, bases morfológicas e fisiológicas da interação do homem com o meio da Universidade Estadual de Maringá-PR

²Farmacêutica-Bioquímica do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá-PR.

³Docente adjunto de Citologia Clínica da Universidade Estadual de Maringá-PR.

⁴Docente assistente de Bacteriologia Clínica da Universidade Estadual de Maringá-PR.

paciente, uso prévio de antimicrobianos, aquisição hospitalar ou comunitária. Em qualquer condição, *Escherichia coli* e outros bacilos Gram-negativos aeróbios, assim como, *Staphylococcus saprophyticus* e *Enterococcus faecalis*, contribuem em mais de 90% dos casos.

A presença de ITU pode ser diagnosticada pela anamnese, exames clínicos e laboratoriais^{8,9,15,16,19,21}. As técnicas mais empregadas incluem a presença de nitritos na análise qualitativa da urina, a determinação quantitativa das bactérias e a cultura da urina (urocultura), sendo este o método considerado como padrão para o diagnóstico de ITU^{18,23}.

O volume de trabalhos que avaliam o exame de urina através das Tiras Reativas de Urina (TRU) para a detecção de parâmetros que alertem sobre uma possível infecção urinária tem aumentado sensivelmente, procurando-se otimizar o uso de provas sensíveis, rápidas, de baixo custo e confiáveis, que identifiquem os casos positivos e alertem para bacteriúrias significativas. Isto porque o método padrão para o diagnóstico das ITU bacterianas, a urocultura, tem desvantagens como a demora no diagnóstico e o alto custo^{7,13}.

O teste de nitritos nas TRU se fundamenta na medida indireta de bactérias redutoras do nitrato a nitrito, incluindo todas as enterobactérias e a maioria das bactérias não fermentadoras, e alguns cocos Gram positivos, que são responsáveis pela maioria dos casos de ITU, quando a elas é fornecido urina que contenha suficiente quantidade de nitrato e que tenha permanecido retida na bexiga por mais de 4 horas¹⁰. Essa reação é identificada pela mudança de coloração da zona de reação da tira; por exemplo, na Combur-8 Test, a reação de nitritos torna-se rosada quando positiva. Desta forma, o presente estudo objetivou avaliar o desempenho da prova de nitritos urinários das TRU para triagem de ITU, através da determinação de sua sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo, tomando como método padrão a urocultura. Procurou-se portanto avaliar a aplicação da prova de nitritos das TRU como método de diagnóstico presuntivo de infecção urinária. Objetivou também estabelecer, para a população em estudo, a frequência de infecção urinária e as bactérias mais comumente envolvidas nesta patologia.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi feito um estudo retrospectivo dos resultados da prova de nitrito e da urocultura de 320 urinas processadas durante o período de janeiro de 1999 a dezembro de 2001, no Laboratório de Ensino e Pesquisa (LEPAC), da Universidade Estadual de Maringá (UEM)/PR. As amostras procederam de pacientes em que havia o pedido médico de urocultura e de exame parcial de urina. Nestas urinas foi verificada a presença de nitritos através das TRUs e determinado o crescimento significativo de bactérias através da urocultura.

Foram atendidos pelo LEPAC pacientes de Maringá e região, da rede privada, de convênios, do Sistema Único de Saúde (SUS-15a Regional de Saúde do Paraná), do ambulatório médico da própria instituição e do ambulatório de especialidades do Hospital Universitário de Maringá (HU).

As amostras de urina foram coletadas através do jato médio de micção espontânea, quando possível, após 6 horas ou mais de incubação na bexiga, preferencialmente, a primeira urina da manhã³. Foram utilizados frascos estéreis e tomados os devidos cuidados de assepsia para a urocultura. O estudo por meio das TRUs foi realizado em tiras Combur-10 Test® (ROCHE Diagnostics), conforme instruções do fabricante. Foram consideradas positivas para nitrito todas as amostras cuja área da TRU para nitritos apresentou tons róseos.

Para a urocultura, as urinas foram semeadas de forma quantitativa com alças calibradas de 1 ou 10µL em placas de ágar Cistina Lactose Deficiente em Eletrólitos (CLED-Biobrás®), incubadas por 24 horas a 35°C, em atmosfera de aerobiose. No urocultivo se valorizou contagem superior a 10.000 UFC por mL, quando em cultura pura¹.

A identificação dos microrganismos foi feita mediante sua morfologia microscópica e diversas provas bioquímicas, enzimáticas e de sensibilidade.

Análise estatística

Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, predição de falso positivo e negativo para a detecção de nitritos pela TRU foi calculada. Postulou-se como método de referência a urocultura.

RESULTADOS

Foram analisadas 320 urinas no período de estudo. Não foi observado crescimento bacteriano no urocultivo de 250 amostras (78,10%) mas ocorreu crescimento em 70 amostras (21,90%). Destas, com crescimento bacteriano em 60 (85,70%) casos, houve crescimento de bacilos Gram negativos (BGN) e em 10 (14,30%) casos, cocos Gram positivos (CGP).

Dos 60 casos com crescimento de BGN, em 29 (48,30%) a prova de nitrito na TRU foi positiva e em 31 (51,70%) negativa, sendo estes dados demonstrados na Tabela 1.

TABELA I

Resultado da prova de nitrito na TRU para casos de urocultura positiva e negativa para BGN.

Nitrito (TRU)	Urocultura		Total
	+	-	
+	29	0	29
-	31	260	291
Total	60	260	320

Sensibilidade: 48,33%; Especificidade: 100,00%; Valor preditivo positivo (PPV): 100,00%; Valor preditivo negativo (NPV): 89,35%; Prevalência: 18,75%; Predição de falso-positivo: 0,00%; Predição de falso-negativo: 10,65%

Dos 60 BGN identificados segundo MURRAY *et al.*¹⁴, 53 (88,30%) convertem nitrato a nitrito em 99-100% dos casos e 7 (11,70%) convertem nitrato a nitrito em 90-95% dos casos.

A tabela 2 descreve a frequência dos BGN identificados na urocultura que convertem nitrato a nitrito em 99-100% dos casos, o resultado da prova de nitritos em TRU e a frequência de falso-negativos nessas amostras.

TABELA II

Descrição e frequência dos BGN que convertem nitrato a nitrito em 99-100% dos casos que foram positivos na urocultura, resultado da prova de nitritos nas TRU e frequência de falso-negativos.

Bactérias Gram negativas	Frequência no total de urinas analisadas (n = 320)		Frequência nas urinas com urocultura positiva (n = 70)		Nitrito positivo (n°)
	n°	%	n°	%	
<i>Escherichia coli</i>	34	10,30	48,60	17	17
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8	2,50	11,40	4	4
<i>Serratia marcescens</i> + <i>Enterobacter cloacae</i>	1	0,30	1,40	1	1
<i>Citrobacter koseri</i> + <i>Escherichia coli</i>	1	0,30	1,40	1	1
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	1	0,30	1,40	1	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> + <i>Escherichia coli</i>	2	0,60	2,80	1	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	0,90	4,30	0	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	0,30	1,40	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i> + <i>Enterobacter sakazaki</i>	1	0,30	1,40	0	0
BGN não fermentador de glicose e leveduras	1	0,30	1,40	0	0
Total	53	16,10	75,50	25	25

A Tabela 3 descreve a frequência dos BGN identificados na urocultura que convertem nitrato a nitrito em 90-95% dos casos, o resultado da prova de nitritos em TRU e a frequência de falso-negativos nessas amostras.

TABELA III
Descrição e frequência dos BGN que convertem nitrato a nitrito em 90-95% dos casos que foram positivos na urocultura, resultado da prova de nitrito na TRU e frequência de falso-negativos.

Bactérias Gram Negativas	Frequência no total de urinas analisadas (n = 320)		Frequência nas urinas com urocultura positiva (n = 70)		Nitrito positivo (n°)	Nitrito negativo (n°)	Frequência de falso-negativos (%)
	(n°)	(%)	(%)	(n°)			
<i>Proteus mirabilis</i>	6	1,9	8,6	3	3		50,00
<i>Proteus pinneri</i>	1	0,3	1,4	1	0		0,00
Total	7	2,2	10,0	4	3		25,00

Dos CGP diagnosticados pela urocultura, a conversão de nitrato a nitrito, segundo MURRAY *et al.*¹⁴, é determinada apenas para: Estafilococos coagulase negativo, que apresenta conversão variável, sendo na maioria das vezes positiva, e para Staphylococcus saprophyticus, cuja conversão é sempre negativa. A Tabela 4 descreve os cocos identificados nas culturas e suas frequências.

TABELA IV
CGP diagnosticados pela urocultura.

Cocos	Frequência nas 320 urinas analisadas		Frequência nas 70 urinas com urocultura positiva (%)
	n°	(%)	
<i>Stomatococcus spp.</i>	1	0,31	1,42
Estafilococos coagulase negativo	2	0,62	2,90
<i>Enterococcus faecium</i>	1	0,31	1,42
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1	0,31	1,42
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	0,62	2,90
Estreptococos- grupo viridans + <i>Enterococcus faecalis</i>	1	0,31	1,42
Estreptococos - grupo viridans	1	0,31	1,42
Estreptococos β hemolítico	1	0,31	1,42
Total	10	3,10	14,30

DISCUSSÃO

De todas as amostras testadas, 21,90% foram consideradas indicativas de infecção. No trabalho realizado por VAN NOSTRAND *et al.*²² observou-se frequência de uroculturas positivas um pouco menor, em torno de 17,00%.

De todas as uroculturas positivas no presente trabalho, em 85,70% foram isolados BGN e em 14,30% CGP. Estes resultados se aproximaram dos de LATORRE *et al.*⁷, cuja frequência de isolamento de BGN foi de 83,02% e são inferiores aos descritos por SANTOS *et al.*¹⁸, que foi de 91,10%. McNAIR *et al.*¹³ obtiveram frequência de CGP de 19,40% em suas uroculturas, valores portanto superiores aos deste estudo. Em todas as bibliografias analisadas, E. coli é relatada como a bactéria mais frequentemente isolada em urocultura. Porém, a frequência do seu isolamento varia consideravelmente entre os autores, sendo de 51,90%, 58,30% e 53,30% segundo SANTOS *et al.*¹⁸, McNAIR *et al.*¹³ e LA-

TORRE *et al.*⁷, respectivamente. O presente estudo demonstra frequência de isolamento desta bactéria de 48,60% (Tabela 2), portanto um pouco inferior aos trabalhos acima citados.

Quanto aos CGP isolados nas uroculturas positivas, McNAIR *et al.*¹³ descrevem que Estreptococos grupo B foi isolado em 11,10% e Estafilococos coagulase negativo em 8,30%. SANTOS *et al.*¹⁸ isolaram Enterococos em 2,30% dos casos e Estafilococos em 4,40%. Os resultados do presente estudo diferem destes dois autores, uma vez que foi isolado Enterococos e Estafilococos, cada um com frequência de 2,80% (Tabela 4).

VAN NOSTRAND *et al.*²² descreveram que a sensibilidade da prova de nitritos na urina pelas TRU foi de 19,20% e a especificidade de 94,90%, enquanto que para ZAMAN *et al.*²³ a sensibilidade foi de 27-30,00% e a especificidade de 93-94,00%. Já para LÓPEZ-ANAYA¹⁰, a sensibilidade foi de 90,00%. O presente trabalho obteve resultados superiores aos dos estudos acima citados, onde a sensibilidade foi de 48,33% e a especificidade de 100,00%. Desta forma, a especificidade da prova de nitritos na urina pelas TRU foi alta em todos os estudos analisados, inclusive o nosso, representando portanto que é muito alta a probabilidade do teste ser negativo sabendo-se que os pacientes examinados não são portadores da doença, o que representa os casos negativos coincidentes entre as provas de nitritos e urocultura. Porém, a sensibilidade mostrou-se muito baixa na maioria dos trabalhos. Isto significa que é baixa a probabilidade do teste de nitritos nas urinas pelas TRU ser positivo sabendo-se que os pacientes examinados são doentes, ou seja, é baixa a probabilidade da prova de nitrito ser positiva nos casos de ITU bacteriana confirmada pela urocultura.

O PPV, ou seja, a probabilidade do paciente estar realmente doente quando o resultado de nitritos pelas TRU é positivo, é de 100,00% em nosso trabalho, levando a uma predição de falso-positivo de 0,00%. VAN NOSTRAND *et al.*²² descreveram PPV de 50,00% e ZAMAN *et al.*²³ de 51-52,00%.

Para o NPV, que é a probabilidade do paciente não estar doente quando o resultado é negativo, o valor foi de 89,35%, indicando uma predição de falso-negativo de 10,65% dos casos. VAN NOSTRAND *et al.*²² descreveram NPV de 81,70% e ZAMAN *et al.*²³ de 82-87,00%.

A presença de 14,30% de CGP identificados pela urocultura contribuiu para o baixo resultado da sensibilidade, sendo que para este tipo de bactéria, a conversão de nitrato a nitrito na urina não está bem estabelecida ou é negativa.

Segundo CRAVER & ABERMANIS², para testes propostos como screening, como a detecção de nitritos pelas TRU, a sensibilidade é mais importante do que a especificidade, pois um bom teste aceita falso-positivos enquanto minimiza falso-negativos. A especificidade é mais importante para testes confirmatórios. Assim, de acordo com os resultados relativamente baixos de sensibilidade para a detecção de nitritos em urinas através das TRU, este parece não ser um bom teste para predizer infecção urinária e propõe-se que o mesmo não deva ser utilizado como método único para triagem de ITU, estando em concordância com os resultados de ZAMAN *et al.*²³ e VAN NOSTRAND *et al.*²².

LÓPEZ-ANAYA¹⁰ adverte, ainda, para o fato de que, sendo a E. coli o principal agente causal das ITU, a determinação de nitritos em urinas através das TRU para esta bactéria não é positiva de maneira significativa. Este mesmo autor encontrou 5,33% dos casos de urocultura positiva para E. coli com nitrito negativo. No presente trabalho, a frequência de falso-negativos da prova de nitritos para E. coli foi de 50,00% (Tabela 2). Sendo esta uma bactéria que reduz ni-

trato a nitrito em 99-100,00%, conforme o descrito pela literatura, casos com urocultura positiva para esta bactéria não poderiam apresentar TRU para nitrito negativo. Para os BGN, descritos por converterem nitrato a nitrito em 99-100,00% dos casos, inclusive a *E. coli*, a detecção de nitritos pelas TRU mostrou-se falso-negativa em 55,00% dos casos (Tabela 2), enquanto que aqueles que convertem nitrato a nitrito em 90-95,00% dos casos, a frequência de falso-negativos foi de 25,00% (Tabela 3). Casos falso-negativos podem ocorrer em decorrência de algumas situações, como: presença de bactérias que não convertem nitratos a nitritos, alta ingestão de vitamina C, impregnação inadequada da TRU, ingestão de antimicrobianos, uso de TRU vencidas, urina que não permaneceu tempo suficiente na bexiga, paciente sem dieta suficiente de nitrato ou redução de nitrito para nitrogênio ou amônia^{10,22}. Porém estes fatores não podem ser responsabilizados por uma frequência tão elevada de falso-negativos.

CONCLUSÃO

A frequência de isolamento de *E. coli*, bactéria mais comumente associada a ITU, foi um pouco inferior ao descrito pela literatura, apesar de ter sido a bactéria mais isolada. O isolamento de CGP no presente trabalho também foi inferior ao das literaturas analisadas.

Apesar da obtenção de altos valores de especificidade PPV e NPV para a prova de nitritos pela TRU, a sensibilidade foi relativamente baixa. Isto indica que este parece não ser um bom teste de screening para infecção urinária e, portanto, não deve ser utilizado como único método para diagnóstico de ITU.

Deve-se, também, alertar para o fato de que a frequência de falso-negativo para os BGN foi, em geral, consideravelmente elevada, e que nenhum dos CGP isolados apresentou nitrito positivo. Isto reforça o fato deste parecer não ser um bom método para a triagem de ITU.

REFERÊNCIAS

1. Clarridge, J.E.; Johnson, J.R.; Pezzlo, M.T. Cumitech-2B laboratory diagnosis of urinary tract infections coordinating. Washington: AS Weissfeld, American Society for Microbiology, 1998.
2. Craver, R.D.; Abermanis, J.G. Dipstick only urinalysis screen for the pediatric Emergency room. *Pediatric Nephrology*, 11: 331-333, 1997.
3. Ferry, S. *et al.* Optimized urinary microscopy for assessment of bacteriuria in primary Care. *The Journal of Family Practice*, 31(2): 153-161, 1990.
4. Figueiredo-Filho, A.M. Infecções urinárias inespecíficas: atualização terapêutica. Manual prático de diagnóstico e tratamento. 16.ed. São Paulo: Artes Médicas, 1993.
5. Figueiredo, J. A. Infecção urinária. *Revista Brasileira de Medicina*, 49: 177-186, 1992.

6. Guidi, H. G. C. *et al.* Infecções no trato urinário baixo. *Revista Brasileira de Medicina*, 52(10): 1125-1134, 1995.
7. Latorre, C. *et al.* Evaluación de la tira reactiva para el diagnóstico de infección urinaria en niños y adultos. *Medicina Clínica (Barcelona)*, 116: 286-289, 2001.
8. Lenz, L. L. Infecção urinária. São Paulo: Fundo editorial BYK, 1994.
9. Lima, A.O. Métodos de laboratório aplicados à clínica técnica interpretação. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.
10. López-Anaya, U. Diagnóstico presuntivo de infección de las vías urinarias mediante la identificación de nitritos con tiras reactiva. *Revista de Sanidad Militar Mexico*, 46: 49-51, 1992.
11. Magalhães, M.; Veras, A. Infecções urinárias femininas associadas ao *Staphylococcus saprophyticus*. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 30: 147-148, 1984.
12. Marangoni, D.V.; Moreira, B.M. Infecções no trato urinário. In: Doenças infecciosas: conduta diagnóstica e terapêutica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.
13. McNair, R.D. *et al.* Evaluation of the centrifuged and Gram-Stained Smear, urinalysis, and reagent strip testing to detect asymptomatic bacteriuria in obstetric patients. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 182(5): 1076-1079, 2000.
14. Murray, P. R. *et al.* Manual of clinical microbiology. 7. ed. Washington: ASM-Press, 1999.
15. Oliveira, E.F.R.; Marques, E.A. Revendo o diagnóstico das infecções urinárias. *Revista Brasileira de Patologia Clínica*, 28: 81, 1992.
16. Rubinsten, I. Infecção urinária como diagnosticar e tratar. *Revista Brasileira de Medicina*, 52: 151, 1995.
17. Sadi, M. V.; Sadi, A. Infecção urinária. *Revista Clínica Geral*, 36: 40, 1989.
18. Santos, S.R.S.R.; Bersani-Amado, C.A.B.; Caparroz-Assef, S. M. Infecções urinárias. *Arquivos de Ciências da Saúde da Unipar*, 3(1):43-50, 1999.
19. Sobel, J. D. *et al.* Principles and practice of infectious diseases. New York: John Wiley & Sons, 1990.
20. Stamm, W. E. Single dose treatment of cystitis. *Journal American Medical Association*, 244: 591, 1980.
21. Vallada, F. P. Manual de exames de urina. 4. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1988.
22. Van Nostrand, J.D. *et al.* Poor predictive ability of urinalysis and microscopic examination to detect urinary tract infection. *American Society of Clinical Pathologists*. 113: 709-713, 2000.
23. Zaman, A. B. *et al.* Disappointing dipstick screening for urinary tract infection in hospital patients. *Journal Clinical Pathology*, 51: 471-472, 1998.

Endereço para correspondência:

Prof. Dr.^a Marcia Edilaine Lopes Consolaro

Departamento de Análises Clínicas

Universidade Estadual de Maringá- Paraná

Av. Colombo, 5790

CEP: 87020-900 Maringá- Paraná-PR

Fone: (44)- 3261-4795; Email: melconsolaro@uem.br

IFCC WORLDBLAB

Fortaleza - Brasil

20º Congresso Internacional de Bioquímica e Medicina Laboratorial

35º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas

8º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica

28 de setembro - 2 outubro/2008

Local:

Centro de Convenções do Ceará

Prevalência de traço falciforme em doadores de sangue da região de Londrina – Paraná*

Sickle cell trait prevalence in blood donors from Londrina area - Paraná

Carolina Grignani¹, Cátia L. Amaral¹, Cristiane A. Iamamoto¹, Tatiana O. Gonçalves¹, Denise A. Mashima², Tiemi Matsuo³, Aparecida L. Perim⁴, Sandra R. Q. Carvalho⁴, José W. Breganó⁴ & Maria Emília Favero⁴

RESUMO - A hemoglobina S (HbS) é uma das alterações hematológicas hereditárias de maior frequência. Os indivíduos homocigóticos apresentam anemia em diversos graus de gravidade, enquanto os heterocigóticos (HbAS) são clinicamente e hematologicamente saudáveis. Assim, os portadores de HbS são considerados aptos à doação de sangue. Entretanto, a utilização do sangue contendo HbS apresenta restrições de uso devido ao potencial de falcização no receptor e existem também dificuldades operacionais durante a leucorredução de concentrados de hemácias. Considerando que a frequência da HbS apresenta variações significativas conforme a região do Brasil, o objetivo deste trabalho foi determinar a prevalência de HbS em doadores de sangue da região de Londrina-PR. Foi realizado um estudo prospectivo, no período de agosto de 2002 a maio de 2003, no qual foram incluídos 6237 doadores atendidos no Hemocentro do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina. A triagem de HbS foi realizada pelo teste de solubilidade em amostras de sangue colhidas em frascos contendo EDTA. A prevalência de HbS na população estudada foi de 1,39% sendo significativamente superior entre negróides (3,72%) quando comparada aos não-negróides (0,82%). Apesar da baixa frequência de HbS na população avaliada, a sua triagem em doadores de sangue é importante porque permite o uso adequado do sangue a ser transfundido.

PALAVRAS-CHAVE - Hemoglobina S, doadores de sangue, prevalência.

SUMMARY - Sickle Hemoglobin (HbS) is the most common inherited hematological disorder. The homozygous state cause anemia while in the heterozygous state (HbAS) there are no associated hematological nor clinical abnormalities. Although individuals with sickle cell trait are accepted for blood donation, the use of hemoglobin AS blood is restricted because of the tendency of the red cells to sickle after transfusion. There are also, operational difficulties during the leukoreduction process of packed red cell units. Considering that HbS frequency varies greatly according to the region of Brazil, the purpose of this work was to determine the prevalence of sickle cell trait among blood donors from Londrina-Paraná. This was a prospective study, carried out from August/2002 to May/2003. Blood samples from 6.237 donors of the blood bank from the Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina were included. The screening for HbS was undertaken by the solubility test using blood collected into EDTA. The prevalence of HbS found in this work was 1,39%, and was significant greatly among black people (3,72%) than in non-black (0,82%). In spite of the low frequency of HbS in this region, the screening of blood donors is important because the blood donated can be properly transfused.

KEYWORDS - Hemoglobin S, blood donors, prevalence.

INTRODUÇÃO

A hemoglobina S (HbS) é uma hemoglobina variante, decorrente da mutação pontual na posição 6 do gene da cadeia globínica β (glu ==> val) denominado gene bs, com conseqüente alteração nas propriedades físico-químicas da molécula. Quando desoxigenada, a HbS apresenta acentuada diminuição na solubilidade e agrega-se formando polímeros. Estas estruturas são responsáveis pela alteração na morfologia (falcização) e diminuição da deformabilidade do eritrócito que levam a hemólise e fenômenos vaso-oclusivos característicos da anemia falciforme (indivíduos homocigóticos)⁽¹⁾.

O indivíduo heterocigótico para o gene β^s é considerado portador sadio e denominado traço falciforme. No entanto, a real morbidade neste caso é bastante controversa uma vez que existem relatos na literatura de morte súbita e complicações clínicas em portadores expostos a condições de baixa tensão de oxigênio como anestesia geral, mergulho, vôo em aviões sem pressurização, bem como na desidratação, em esforços físicos extenuantes, na infecção grave e episódios de acidose⁽²⁾. A opinião mais comum é de que essas complicações ocorram muito raramente já que o baixo potencial de falcização dos heterocigotos exige que os fatores desencadeantes (hipóxia, acidose e desidratação) sejam muito intensos^(1,3).

No Brasil, mais de 8.000 pessoas apresentam anemia falciforme (forma homocigota), e cerca de 2 milhões de pessoas são portadoras do traço falciforme. Estima-se, a cada ano, o nascimento de 700-1000 novos casos de portadores de doenças falciformes, incluindo a formas interativas com outras anormalidades hereditárias da Hb^(2,4). Uma vez que esta alteração genética tem origem no continente africano, a prevalência do gene bs apresenta diferenças regionais decorrentes do processo de miscigenação e migração da população brasileira, variando entre 1 e 2% na região sul e 6 a 10% entre negros e pardos na região nordeste^(2,5).

Indivíduos com traço falciforme são clinicamente e hematologicamente saudáveis e, portanto, aptos à doação de sangue. Entretanto, a utilização deste sangue é restrita, principalmente em portadores de hemoglobinopatias, na acidose grave, nos recém-nascidos e na transfusão intra-uterina devido ao potencial de falcização no receptor, e também pelas alterações no produto hemoterápico como conseqüência do processamento e estocagem^(6,7,8). Assim, a fim de aumentar a eficácia terapêutica das transfusões sanguíneas, a triagem de hemoglobinas anormais entre os doadores de sangue passou a ser obrigatória a partir de junho de 2004, conforme a Resolução de Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária- RDC 153/04⁽⁶⁾. Além dos possíveis problemas decorrentes da transfusão

Recebido em 16/02/2006
Aprovado em 07/07/2006

*Trabalho realizado no Setor de Hematologia do Laboratório de Análises Clínicas da Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina (UEL)
¹Acadêmicas do curso de Farmácia-Bioquímica da UEL; ²Médica hematologista – Centro de Ciências da Saúde – UEL; ³Estatística – Centro de Ciências Exatas – UEL; ⁴Farmacêutico-bioquímico – Centro de Ciências da Saúde – UEL

de eritrócitos contendo HbS, estão sendo relatadas dificuldades operacionais durante o processamento deste sangue, principalmente na obtenção de concentrado de hemácias pobre em leucócitos. A filtração incompleta ou com tempo maior para a realização do procedimento^(9,10) ocorre pela obstrução dos filtros e pode ser atribuída a diminuição da deformabilidade do eritrócito causada pela polimerização da HbS.

O objetivo deste trabalho foi determinar a prevalência do gene da HbS em doadores da região de Londrina e verificar a correlação com as características da população estudada, pois não existem dados atuais sobre o assunto para esta região.

METODOLOGIA

População estudada

Foi realizado um estudo de coorte transversal, prospectivo, no qual foram incluídos os doadores de sangue atendidos no Hemocentro do Hospital Universitário (HU) da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e nos bancos de sangue das cidades de Cornélio Procópio e Jacarezinho durante o período de agosto de 2002 a maio de 2003.

As informações sobre naturalidade, raça, idade e sexo foram obtidas a partir do banco de dados do Hemocentro. Devido a variável raça estar classificada em várias etnias, para este estudo, considerou-se dois grupos: o grupo negro, composto pelos doadores pardos e negros, e não-negro, composto por brancos e amarelos.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa envolvendo seres humanos do HU/UEL.

Coleta de sangue

Para a pesquisa da HbS, de cada doador, foram colhidos 4,0 mL de sangue em frascos contendo EDTA como anti-coagulante e utilizando-se o sistema de coleta a vácuo. As amostras foram preservadas a 4°C até o momento da realização do teste de solubilidade da HbS.

Teste de solubilidade da HbS

O procedimento utilizado foi adaptado a partir da metodologia descrita por Naoum, 1997⁽¹¹⁾. Resumidamente, 50 µL de sangue foram adicionados em 0,5 mL de solução de ditionito de sódio a 1% em solução tampão fosfato. Para a visualização do resultado, 10 µL da suspensão acima foi colocada em papel de filtro grau quantitativo 50. A hemoglobina S precipitada não se difunde no papel de filtro, formando um botão central facilmente identificado enquanto os testes negativos apresentam uma mancha homogênea (Fig. 1). Controles positivos foram realizados diariamente.

Análise estatística

Para a análise estatística foram consideradas 6.237 amostras, pois foram excluídas 801 amostras provenientes de doações repetidas. As associações entre a positividade para HbS e as características dos doadores foram avaliadas com o teste de qui-quadrado. Calculou-se a razão de prevalência e o seu intervalo de confiança de 95% quando a associação foi significativa ($p < 0,05$).

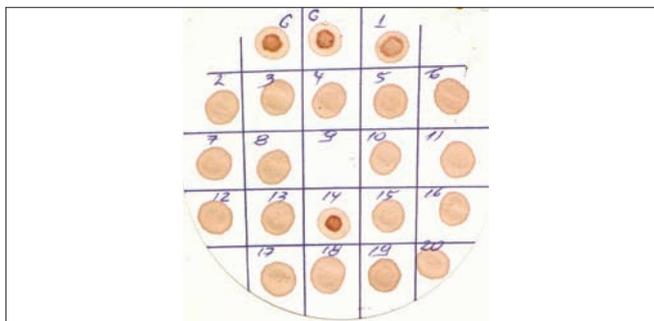


Figura 1: Visualização do teste de solubilidade da HbS em papel de filtro. C: Controles positivos; 1 e 14: amostras positivas; 2-13 e 15-20: amostras negativas.

RESULTADOS

A população analisada neste estudo foi caracterizada pelo predomínio de indivíduos na faixa etária de 18-25 anos (42,6%) (Tab. 1) e do sexo masculino (65,6%) (Tab. 2). Quanto ao grupo racial, 5001 (80,2%) foram classificados como não-negróides, 1235 (19,8%) como negróides e em apenas um doador esta informação não estava disponível no banco de dados do Hemocentro (Tab. 2). De acordo com a naturalidade, 4790 (79,34%) dos doadores eram procedentes da região sul do Brasil e apenas 156 (2,58%) do nordeste (Tab. 3).

Entre os 6237 doadores estudados, 87 (1,39%) apresentaram resultados positivos no teste de solubilidade. Considerando o sexo (Tab. 2), não houve diferença significativa na frequência de positividade da HbS ($p=0,9856$). Entretanto, a frequência de portadores de HbS foi significativamente superior ($p < 0,0001$) entre negróides (3,72%) quando comparada ao grupo não-negro (0,82%) (Tab. 2). A razão de prevalência entre os grupos foi de 4,54 [I.C. 95%: 3,00 – 6,89]. Comparando-se a frequência de HbS de acordo com a naturalidade dos doadores (Tab. 3), não houve diferença significativa ($p=0,2780$).

TABELA I
Distribuição da positividade da HbS em doadores de sangue de acordo com a faixa etária.

	Faixa etária*				
	18-25 n** (%)	26-35 n (%)	36-45 n (%)	46-55 n (%)	56-65 n (%)
HbS – Positivo	28 (1,05)	22 (1,82)	23 (1,82)	10 (1,46)	4 (2,80)
HbS – Negativo	2631	1461	1242	677	139
Total	2659	1483	1265	687	143

* $\chi^2=6,05$, gl=5, valor de $p=0,1951$

** n= número de amostras analisadas

TABELA II
Comparação da frequência da HbS de acordo com sexo e grupo racial.

	Sexo*		Grupo racial **	
	Masculino n (%)	Feminino n (%)	Não-negro n (%)	Negro n (%)
HbS Positivo	57 (1,39)	30 (1,40)	41 (0,82)	46 (3,72)
HbS Negativo	4.035	2.115	4.960	1.189
Total	4.092	2.145	5.001	1.235

* $\chi^2=0,0$, gl=1, valor de $p=0,9856$

** $\chi^2=42,91$, gl=1, valor de $p < 0,0001$

TABELA III
Comparação da frequência de HbS de acordo com a naturalidade.

	Naturalidade*				
	S n (%)	SE n (%)	NE n (%)	CO n (%)	N n (%)
HbS Positivo	68 (1,42)	13 (1,20)	4 (2,56)	0	1 (5,56)
HbS Negativo	4.722	1.066	152	72	17
Total	4.790	1.079	156	72	18

$\chi^2=5,09$, gl=4, valor de p < 0,2780

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Neste trabalho, a triagem de portadores de traço falciforme foi realizada através do teste de solubilidade, metodologia que se baseia na insolubilidade da Hb S quando no estado reduzido. As hemoglobinas normais e as variantes comuns, como por exemplo, C, D, N, I são solúveis nestas condições, de forma que o teste é específico para HbS⁽¹²⁾. Segundo SURVE, 2000, o teste de solubilidade pode ser utilizado em triagens para determinar a prevalência de Hb S em diferentes grupos populacionais porque apresenta sensibilidade de 93,8% e especificidade de 100% com valor preditivo positivo de 100% e valor preditivo negativo de 96,7%⁽¹³⁾. Além do mais, o teste é de fácil execução e não necessita de treinamento especial por parte da equipe técnica para sua realização⁽¹⁴⁾. Entretanto, Prudêncio (2000), relata que resultados falso-positivos podem ser observados em condições como: policitemia, mieloma múltiplo, hemoglobina de Bart's, Hemoglobina C Harlem, transfusão recente, insuficiência renal crônica e excesso de sangue na reação; e que resultados falso-negativos podem ser obtidos se a concentração de hemoglobina for inferior a 7g%, quando a HbS estiver presente em pequena quantidade (no recém-nato e após transfusão), se houver deterioração e inatividade dos reagentes, ou ainda pelo uso de quantidade inadequada de sangue na realização do teste⁽¹²⁾. Observa-se que as condições patológicas citadas não são encontrados na população de doadores estudada, pois os mesmos são excluídos na triagem pré-transfusional, e que condições de problemas técnicos podem ser controladas com o uso de técnicas bem padronizadas e amostras controle para o ensaio. Assim, no estudo realizado, optou-se apenas pelo teste de solubilidade apesar de não ser o teste padrão para detecção de hemoglobina S como a eletroforese de hemoglobina e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Segundo Naoum (1997), a prevalência média de portadores do traço falciforme no Brasil é de 2,1%, sendo que no estado do Paraná este valor encontra-se entre 1-2%⁽¹⁵⁾. A prevalência de HbS obtida neste trabalho pode ser considerada baixa se comparada com a região Nordeste mas, está próxima aos valores citados na literatura para a região Sul. No entanto, houve considerável aumento desta prevalência com relação ao trabalho realizado por Naoum (1987), no qual a prevalência de HbS na cidade de Londrina foi de 0,77%⁽¹⁶⁾. O aumento observado demonstra a importância da triagem de Hb S em doadores de sangue.

Ao comparar a prevalência da HbS de acordo com o grupo racial, verificou-se que a positividade para o gene bs apresenta associação significativa com a população negra, o que está de acordo com os dados descritos na literatura^(1,3). Em relação ao sexo dos doadores, não houve diferença significativa na prevalência do fenótipo bs, uma vez que os ge-

nes que controlam a síntese da cadeia b da globina não são restritos por esta condição. Também quanto à distribuição do gene não foi encontrada nenhuma relação estatisticamente significativa com a faixa etária pois a expressão do gene não é alterada nas diferentes fases da vida.

Em virtude dos resultados obtidos, vale ressaltar a importância da utilização do teste de solubilidade na triagem de doadores de sangue para a identificação dos portadores de traço falciforme, o que permite o uso mais adequado do sangue a ser transfundido^(7,8,17-19). Além disso, devem ser levados em consideração os aspectos epidemiológicos e educacionais de orientação aos portadores do traço falciforme, começando com a implantação do serviço obrigatório de triagem não só para doadores de sangue como também para gestantes e recém-nascidos⁽²⁰⁻²³⁾.

REFERÊNCIAS

1. NAOUM, PC; DOMINGOS, CRB. Doença falciforme no Brasil. Origem, genótipos, haplótipos e distribuição geográfica. J Bras Patol, 33(3):145-153,1997.
2. OLIVEIRA, F. Saúde da população negra : Brasil ano 2001. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, 2003. 344p.
3. NAOUM,PC; ÁLVARES FILHO, F; DOMINGOS, CRB; FERRARI, F; MOREIRA, HW; SAMPAIO, ZA; MAZIERO, PA; CASTILHO, EM. Hemoglobinas anormais no Brasil: prevalência e distribuição geográfica. Rev Bras Patol Clín, 23(3):68-72,1987.
4. ANVISA. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doença Falciformes – Brasília. 2002. 142 p.
5. ZAGO, MA; SILVA JR, WA; FRANCO, RF. Hemoglobinopathies and other hereditary hematological diseases in the Brazilian population. Ciência e Cultura: Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science, 51(3/4):226-234, 1999.
6. BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria nº 153 de 14 de junho de 2004. Aprova as normas técnicas para coleta, processamento e transfusão de sangue, componentes e derivados e dá outras providências. Brasília.
7. MARQUES JR, JFC. Transfusão de hemácias contendo hemoglobina S. Bol Soc Bras Hematol Hemoter. XVI (166):229-232, 1994.
8. VERAS, MS; COELHO, SBV; SOUSA, J; CARDOSO, L; SANTOS, JF. Prevalência do traço falciforme em doadores de sangue do Distrito Federal. Rev Saúde Dist Fed, 9 (1): 9-12, 1998.
9. KRILADSIRI, P; SEGRATCHIAN, J. Leucoreduction of sickle cell trait blood: an unresolved issue. Transfus Apheresis Sci, 24: 223-225, 2001.
10. STRONCEK, DF; RAINER, T; SHARON, V; BYRNE, KM; NOGUCHI, CT; KLEIN, HG; ACHECHTER, AN; LEITMAN, SF. Sickle Hb polymerization in RBC components from donors with sickle cell trait prevents effective WBC reduction by filtration. Transfusion, 42: 1466-1472, 2002.
11. NAOUM, PC; DOMINGOS, CRB. Técnicas laboratoriais para identificação das hemoglobinas normais e anormais. In: Hemoglobinopatias e Talassemias. Ed. Sarvier: São Paulo, 1997. p. 155-156.
12. PRUDÊNCIO, BCAB, COVAS, DJ; DOMINGOS, CRB. Comparação de metodologia utilizada para a detecção de hemoglobina S (HbS) em doadores de sangue. Rev Bras Hematol Hemoter, 22 (2):99-109, 2000.
13. SURVE, RR; MUKHERJEE, MB; KATE, SL; NAGTILAK, SB; WADIA, M; TAMANKAR, AA; GHOSH, K; COLAH, RB; MOHANTY, D. Detecção of the -S gene: an evaluation of the solubility test against automated chromatography and haemoglobin electrophoresis. Br J Biomed Sci; 57 (4):292-294, 2000.
14. OSHIRO, M; POLINETO, A; MIGUITA, K; WATANABE, CI; PALHARINI, DLB. Estudo comparativo entre os testes de solubilidade, falcização e gel-centrifugação para detecção populacional de hemoglobina S. Rev Inst Adolfo Lutz, 58 (2):53-56, 1999.
15. BEZERRA,TMM; ANDRADE,SR. Investigação sobre prevalência de hemoglobinas anormais entre doadores de sangue. Rev Bras Anal Clin, 23(4):117-118, 1991.
16. MELO, SMA; ARANTES, SCF; BOTELHO FILHO, A; ROCHA,

AFS;SILVEIRA, EP. Prevalência de Hemoglobinopatias em Doadores de Sangue do Hemocentro Regional de Uberlândia-MG, Bol Soc Bras Hemat Hemot, 20 (suplemento), p. 130, 1998.

17. VICHINSKY, EP. Current issues with blood transfusion in sickle cell disease. Semin Hematol, 38 (Suppl 1):14-22, 2001.
18. FLEURY, MK; LIMA, JCS. Resultados de um programa preventivo para hemoglobinopatias na cidade do Rio de Janeiro. Rev Bras Pat Clin, 25(2): 42-45, 1989.
19. PANTALEÃO, SM; MEDEIROS, FJG; NUMESMAIA, HGS; VIEIRA, J. Triagem de hemoglobinopatias estruturais em recém-nascidos de João Pessoa-PB. Rev Bras Pat Clin, 29(1):8-12, 1993.
20. PAIVA E SILVA, RB; RAMALHO, AS: Riscos e benefícios da triagem genética: o traço falciforme como modelo de estudo em uma população brasileira. Cad Saúde Públ, 13 (2):285-294, 1997.
21. RAMALHO, AS; TEIXEIRA, RC; TEIXEIRA, PA; COMPRI, MB; STEL-

LA, MB; POLIMENTO, NC. Genética e saúde pública no Brasil – Os programas comunitários de hemoglobinopatias hereditárias. Anais da Academia Nacional de Medicina, 156(1):13-18, 1996.

Endereço para correspondência:

Profª Maria Emília Favero
Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas -
Centro de Ciências da Saúde
Av. Robert Koch, 60. Bairro Cervejaria. Cx Postal 1562
CEP 86038-440 Londrina -Paraná
e-mail: mfavero@uel.br
fone: (43) 3371-2322



Sociedade Brasileira de Análises Clínicas®

IFCC WORLDLAB Fortaleza - Brasil

20º Congresso Internacional de Bioquímica e Medicina Laboratorial
35º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas
8º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica

28 de setembro - 2 outubro/2008

Local:
Centro de Convenções do Ceará

Seroprevalência de HIV-1/2 entre doadores de sangue de Goiânia-Goiás*

Seroprevalence of HIV- 1/2 among blood donors of Goiânia (Goiás state, Brazil)

Keury Inácio Gonçalves¹, Eduardo Martins de Souza¹, Lorena Sales Modesto¹, Aline Folador da Fonseca¹ & Keila Correia de Alcântara²

RESUMO - A aids ainda é uma doença incurável, mas as vias de transmissão são bem conhecidas. Por isso, maior importância tem sido prestada à prevenção da transmissão do HIV. O objetivo deste estudo foi avaliar a prevalência do HIV entre doadores de sangue no Hemocentro de Goiânia, entre 2002 e 2003. O estudo retrospectivo foi realizado através das fichas de triagem clínica e do banco de dados do Hemocentro. De 41.033 doadores, 136 (0,33%) apresentaram sorologia positiva para HIV, 1.903 (4,6%) para Hepatite B, 172 (0,45%) para hepatite C e 353 (0,86%) para sífilis. Entre os 136 doadores HIV positivo, mais de 30% eram jovens com idade entre 18 e 25 anos e 20,6 % já haviam doado sangue anteriormente ($p < 0,001$). Notou-se redução significativa ($p < 0,001$) do número de bolsas com triagem positiva para HIV-1/2 de 2002 ($n=94$) para 2003 ($n=42$). A diminuição da frequência de bolsas com triagem positiva para HIV-1/2 e a menor prevalência desta soropositividade entre os doadores de repetição sugerem um aumento da qualidade do sangue transfundido.

PALAVRAS-CHAVE - doadores de sangue; HIV; HBV, HCV; soroprevalência.

SUMMARY - The cure for AIDS remains unknown, but its transmission mechanisms are well known. Emphasis has been placed on the importance of preventing HIV transmission. The objective of this study was to evaluate the prevalence of HIV between blood donors at the Hemocentro of Goiânia city between 2002 and 2003. The retrospective study was carried on using clinical reports and data base of Hemocentro. Of Among total 41,033 analyzed blood donors, 136 (0.33%) were screened HIV 1/2 seropositive, 1,903 (4.6%) Hepatitis B, 172 (0.45%) Hepatitis C and 353 (0.86%) were Syphilis seropositive. Between 136 blood donors HIV positive, more than 30% were young between 18 and 25 years old and 20.6 % had done blood donation previously. Significant reduction ($p < 0.001$) of the number of HIV-1/2 positive blood units was observed from 2002 ($n=94$) to 2003 ($n=42$). The reduction of blood units HIV-1/2 positive and of the prevalence of this seropositivity among the repetition donors suggest more quality of the transfused blood.

KEYWORDS - blood donors; HIV; HBV; HCV; seroprevalence.

INTRODUÇÃO

A síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) foi descrita pela primeira vez em 1981 e o vírus causador da mesma, que ficou conhecido como Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), foi isolado e identificado em 1983;¹¹. Atualmente, cerca de 40 milhões de pessoas estão vivendo com HIV/SIDA em todo mundo²¹. No Brasil, até junho de 2004 foram notificados 362.364 casos desta síndrome e 20,3% (63.000 casos) correspondem à categoria de exposição sanguínea, sendo mais de 2.000 pessoas vítimas da infecção por transfusão de sangue⁵.

As principais formas de transmissão do HIV são: sexual, ocupacional, vertical e sanguínea. As categorias de exposição sanguínea abrangem os usuários de drogas injetáveis que compartilham seringas e agulhas, os hemofílicos e aqueles contaminados por transfusão sanguínea¹. Como as vias de transmissão do HIV são bem conhecidas, ênfase maior tem sido dada aos meios de prevenção da transmissão. Em bancos de sangue, uma das principais formas de evitar a transmissão, não só do HIV, mas de outros agentes infecciosos, consiste em um rigoroso controle da qualidade do sangue a ser transfundido.

Os exames laboratoriais utilizados atualmente em banco de sangue para a triagem da infecção pelo HIV detectam a presença de anticorpos específicos para o HIV 1/2. Apesar destes exames serem bastante sensíveis, existe um período de janela imunológica correspondente ao início da infecção e o aparecimento de anticorpos no sangue, o que pode ocasionar resultados falsos negativos^{19, 23}.

Devido ao grande impacto dessa epidemia, a possibilidade de soroconversão e a dificuldade do diagnóstico de infecção pelo HIV no período de janela imunológica, tornou-se necessária a implementação de normas técnicas para a triagem sorológica de bolsas de sangue. Está contemplada na legislação brasileira que a incorporação da técnica de biologia molecular NAT na triagem laboratorial dos doadores de sangue diminui o período de janela imunológica para a identificação das contaminações por HIV e HCV e que a incorporação do NAT reduziria o risco de transmissão destes agentes virais, por transfusões de hemocomponentes, aumentando a segurança transfusional⁴.

Este estudo teve como objetivo principal avaliar a prevalência do HIV entre os doadores de sangue do Hemocentro de Goiânia, entre 2002 e 2003, através da análise destes doadores de acordo com o sexo, idade e estado civil e possíveis casos de soroconversão entre os doadores que, frequentemente, doavam sangue naquela instituição.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto para o desenvolvimento do presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana e Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (processo nº137/04).

Foi realizada revisão sistemática do banco de dados HEMOVIDA coordenado e implantado pelo Datasus, bem como, das fichas de triagem clínica dos doadores que buscaram o Hemocentro de Goiânia entre janeiro de 2002 e dezembro de 2003. Neste período, foram encontrados 136 ca-

Recebido em 01/11/2005

Aprovado em 01/08/2006

*Hemocentro de Goiânia-Goiás

¹Biomédicos, graduados pela Sociedade de Cultura do Estado de Goiás – Faculdade Padrão.

²Biomédica, Professora Mestre do Departamento de Farmácia-Bioquímica da Universidade Estadual de Goiás – UEG e do Departamento de Biomedicina da Sociedade de Cultura do Estado de Goiás - Faculdade Padrão.

dos de doadores com triagem positiva para HIV-1/2 e, destes, foi possível analisar os dados demográficos e sorológicos disponíveis no sistema de informação.

Para análise do perfil sócio-cultural e a presença ou não de outras doenças sexualmente transmissíveis, a população inclusa neste estudo foi dividida em dois grupos: doadores da Coleta Externa e doadores da Coleta Interna. Os doadores que buscaram as unidades móveis do Hemocentro, destinadas a atenderem outras regiões dentro da própria cidade de Goiânia e de cidades do interior do Estado de Goiás, foram denominados grupo de coleta Externa e aqueles, cuja doação foi realizada exclusivamente dentro do Hemocentro, fizeram parte do grupo de Coleta Interna.

Foram calculadas frequências, médias e medianas para as principais variáveis e o teste do χ^2 para análise de significância estatística utilizando-se o programa EPI Info 6.04 (CDC Epidemiology Program Office, Atlanta, USA & WHO Global Programme on AIDS, Geneva, Switzerland).

RESULTADOS

Do total de 41.033 doações realizadas entre janeiro de 2002 e dezembro de 2003, 136 (0,33%) bolsas apresentaram sorologia positiva para HIV-1 e 2. A mediana de idade dos doadores com soropositividade para HIV foi de 31,5 anos (18 – 60 anos). A grande maioria (83,1%) era do sexo masculino, 47,8% eram casados e aproximadamente 31% tinham entre 8 e 11 anos de estudo que corresponde, respectivamente, ao ensino fundamental e ensino médio completos. Mais de 60% (n=83) dos doadores HIV1/2 positivos eram doadores voluntários e 20,6% já haviam doado sangue anteriormente ($p < 0,001$). As características de doação podem ser vistas na Tabela 1.

TABELA I
Perfil dos doadores com triagem positiva para HIV 1/2 estratificados em grupos de Coleta Interna e Coleta Externa (n=136).

	Coleta Interna		Coleta Externa		Total	
	n	%	n	%	n	%
Sexo						
Masculino	53	89,8	60	77,9	113	83,1
Feminino	6	10,2	17	22,1	23	16,9
Idade (anos)						
18 - 25	18	30,5	25	32,5	43	31,6
26 - 30	12	20,3	10	13	22	16,2
31 - 35	8	13,6	11	14,2	19	14,0
36 - 40	11	18,7	16	20,8	27	19,8
41 - 49	7	11,8	13	16,9	20	14,7
> 50	3	5,1	2	2,6	5	3,7
Estado Civil						
Solteiro	27	45,8	38	49,4	65	47,8
Casado	31	52,5	30	39,0	61	44,8
Viúvo	1	1,7	1	1,3	2	1,5
Não registrado	0	0	8	10,4	8	5,9
Tipo de Doação						
Específica	31	52,5	0	0	31	22,8
Voluntária	28	47,5	55	71,4	83	61,0
Não registrado	0	0	22	28,6	22	16,2
Característica da doação						
1ª Doação	20	33,9	8	10,4	43	31,6
Doação repetida	26	44,1	17	22,1	28	20,6
Não registrado	13	22	52	67,5	65	47,8
Escolaridade (anos de estudo)						
Zero	0	0	1	1,3	1	0,7
1-3	2	3,4	0	0	2	1,5
4-7	15	25,4	26	33,8	41	30,1
8-11	28	47,5	14	18,1	42	30,9
12 ou mais	11	18,6	12	15,6	23	16,9
Não registrado	3	5,1	24	31,2	27	19,9
TOTAL	59	43,38	77*	56,62	136	100

*Difere do grupo de coleta interna para $p < 0,001$.

Em ambos os sexos, mais de 30% eram jovens com menos de 25 anos de idade e solteiros. Entre as mulheres, foi possível observar que mais de 20% já havia doado sangue alguma vez, enquanto que no sexo masculino predominou aqueles que estavam doando sangue pela primeira vez (33,6%). A tabela 1 também mostra as características de doação entre os grupos de coleta interna e externa. Quando este grupo de doadores foi estratificado em grupos de coleta interna e externa, foi possível observar que das 136 bolsas triadas com sorologia positiva para HIV, 56,6% eram provenientes da coleta externa ($p < 0,001$). A mediana de idade em ambos os grupos foi de aproximadamente 30 anos e mais de 30% eram jovens entre 18 e 25 anos de idade. Entre os doadores HIV+ do grupo da coleta externa 77,9% (n = 60) e 89,8% (n = 53) do grupo da coleta interna eram do sexo masculino. Quanto ao estado civil e a escolaridade, 52,5% dos doadores do grupo da coleta interna eram casados e quase 50% tinham entre 8 e 11 anos de estudo. Entre os doadores do grupo da coleta externa 49,4% eram solteiros e 33,8% tinham entre 4 e 7 anos de estudo. Observou-se, ainda, que 52,5% dos doadores da coleta interna eram específicos e mais de 70% dos doadores da coleta externa eram voluntários. Em ambos os grupos a maioria dos doadores já haviam doado sangue pelo menos uma vez.

Em 2002 houve 20.482 doações de sangue, enquanto que em 2003 foram registradas 20.551, sendo que o número de bolsas com triagem positiva para HIV-1/2, no ano de 2002, foi maior (n = 94) do que em 2003 (n = 42) ($p < 0,001$), tabela 2.

Outros marcadores sorológicos, como HBsAg, anti-HBc, anti-HCV e VDRL, que resultam no descarte das bolsas de sangue, também foram analisados. Das 41.033 doações, entre 2002 e 2003, 1.903 (4,64%) apresentaram positividade para Hepatite B, 172 (0,42%) para hepatite C e 353 (0,86%) para Sífilis. Entre os doadores HIV+, aproximadamente 12% (n = 16) tinham resultados positivos para os marcadores sorológicos da Hepatite B e C (anti-HBc, HBsAg e anti-HCV) e 2,9% (n = 4) eram soropositivos para sífilis. Três, dos 136 doadores HIV+, apresentaram sorologia positiva para Hepatite B e sífilis. Entre os 16 casos de sorologia positiva para Hepatite (HBsAg, anti-HBc e anti-HCV), 10 (62,5%) foram encontrados entre os doadores da coleta externa, assim como 3 (75%) dos 4 casos de sorologia positiva para sífilis. A Tabela 2 representa os marcadores sorológicos concomitantes à sorologia positiva para HIV 1/2 nos anos de 2002 e 2003.

TABELA II
Marcadores sorológicos concomitantes à sorologia positiva para HIV 1/2 nos anos de 2002 e 2003 (n=136)

Marcadores Sorológicos	2002		2003		TOTAL	
	n	%	n	%	n	%
HIV	81	86,2	35	83,3	116	85,3
HIV e Hepatite B	10	10,6	4	9,6	14	10,3
HIV e Hepatite C	2	2,1	0	0	2	1,5
HIV e Sífilis	1	1,1	3	7,1	4	2,9
TOTAL	94	69,1	42*	30,9	136	100

*difere do ano anterior para $p < 0,001$

Houve um caso de soroconversão de um doador voluntário do sexo masculino de 23 anos de idade, proveniente da coleta externa no ano de 2003. Este doador já havia doado sangue duas vezes no Hemocentro de Goiânia, sendo que a doação anterior com sorologia negativa para HIV ocorreu em março de 2002. Esta bolsa não foi transfundida devido às intercorrências no fracionamento como baixo volume das bolsas.

DISCUSSÃO

Dados sobre a prevalência de sorologia positiva para HIV entre os doadores de sangue no Brasil ainda são escassos, mas é possível observar que houve redução nos casos de contaminação por transfusão, notificados ao Ministério da Saúde na década de noventa⁵. A redução em indivíduos transfundidos pode ser explicada pelos métodos utilizados na triagem do doador, que busca eliminar doadores com comportamento de risco e a diminuição do período de janela imunológica por ensaios mais sensíveis para detecção de anticorpos anti-HIV. Além disso, a implantação dos Centros de Testagem e Aconselhamento (CTAs) no Brasil, por volta de 1996, permitiu que a população pudesse ter acesso aos resultados sorológicos para a infecção pelo HIV/aids gratuitamente e de forma anônima sem necessitar buscar os bancos de sangue para este fim, apesar de muitos ainda o fazerem^{10, 18}.

A prevalência de doadores com triagem positiva para HIV, na população analisada, foi de 0,33%. Em investigações realizadas em outras regiões do Brasil e do mundo a prevalência tem mostrado em torno de 0,20%^{1, 8, 22}. É sempre importante enfatizar que esses estudos, assim como este, trabalharam com um grupo selecionado por entrevista, triagem clínica e voto de auto-exclusão, eliminando, assim, doadores com risco de infecção pelo HIV⁶.

Mais de 30% da população analisada tinham entre 18 e 25 anos de idade na época da doação. Segundo Szwarcwald *et al.* (2004)²⁰, o nível de conhecimento das formas de transmissão do HIV entre os mais jovens (15-24 anos) é muito menor quando comparado com pessoas com mais de 25 anos de idade e menos de 25% nunca fizeram testagem para HIV. Com relação ao estado civil, é importante ressaltar que as respostas dadas pelos indivíduos muitas vezes não correspondem à condição oficial de seus documentos e sim, ao conceito que cada um tem de sua própria situação. Na população investigada, mais de 20% das mulheres se declararam casadas. De acordo com dados recentes, a maioria das mulheres infectadas pelo HIV considera manter uma relação estável e monogâmica e, por isso, não usam métodos preventivos³.

Assim, como em outras pesquisas já realizadas no Brasil e no mundo^{1, 17, 22}, a prevalência de soropositividade entre os doadores que estavam doando sangue pela primeira vez foi estatisticamente maior do que entre os que já haviam doado sangue. Isto porque as pessoas que doam sangue regularmente são triadas todas as vezes que vão ao banco de sangue e constituem um grupo de baixo risco de contaminação. Além disso, pessoas que obtiveram resultado positivo anteriormente são consideradas inaptas para doar novamente. Sabe-se, ainda, que o uso da doação de sangue como um meio para obter testagem para HIV por pessoas com alto risco de contaminação por este vírus, entre os de primeira doação, contribui para a maior prevalência de soropositividade entre aqueles que doam sangue pela primeira vez.

Em relação aos grupos de coleta interna e externa, as diferenças principais estão relacionadas ao maior número de soropositividade e menor escolaridade na população da coleta externa. Este dado corrobora alguns aspectos relevantes ao nível de saúde pública uma vez que há possibilidade de alguns doadores, principalmente mais desfavorecidos, estarem usando os testes de triagem para HIV dos bancos de sangue para verificar sua possível soropositividade e obter o resultado de forma rápida, gratuita e confiável^{10, 18}. Este procedimento por parte de alguns doadores

de sangue contribui para o aumento do risco de resultados falso-negativos devido maior chance de estar realizando o exame no período de janela imunológica.

Nesta abordagem, observou-se uma diminuição na soroprevalência para HIV, HBV, HCV e sífilis no ano de 2003 quando comparado com o ano anterior. Outros autores^{7, 17, 24} relataram que a prevalência de soropositividade para estes marcadores de doenças infecciosas demonstraram também queda significativa desde o início da década de 90 e, conseqüentemente, houve menor número de descarte de bolsas por inaptidão sorológica. Esta queda é reflexo da introdução de um sistema informatizado entre os bancos de sangue que impede novas doações por indivíduos com sorologia reativa anteriormente para um ou mais marcadores sorológicos e a presença de programas de controle da qualidade que minimizam os erros; e como resultado final tem-se a conquista cada vez maior de doadores de repetição e incremento na qualidade do sangue coletado¹⁷.

A soropositividade concomitante para HIV, HBV e HCV nesta população foi de aproximadamente 12%, enquanto no sul e sudeste do Brasil esta prevalência foi superior a 30%^{15, 16}. Quando observada a prevalência de sorologia isolada para HBV, HCV e sífilis, os resultados obtidos foram, respectivamente, de 4,64% (n=1.903), 0,42% (n=172) e 0,86% (n=353), resultados estes semelhantes aos observados no norte do Paraná (com exceção de maior prevalência para HBV – 10,5%)¹⁵.

Houve um caso de soroconversão identificado no período estudado. Não houve como averiguar, na ocasião da doação anterior, se o doador estava no período de janela imunológica. Os critérios clínicos, comportamentais, laboratoriais e auto-exclusão consciente ainda não conseguem excluir totalmente os indivíduos no período de janela imunológica. A evolução tecnológica e científica tem ajudado muito no que diz respeito às tentativas de minimizar os riscos oferecidos por transfusão de sangue. Os testes de ELISA de 4ª geração atingem praticamente 100% de sensibilidade e diminuem para três semanas o período de janela imunológica¹³. Recentemente, a técnica de amplificação do ácido nucléico (NAT) para triagem de HIV e HCV em bancos de sangue tem sido obrigatória em alguns países como Alemanha e Estados Unidos da América. Isto porque o NAT possui sensibilidade muito alta e reduz o período de janela imunológica para seis a sete dias. Além disso, tem sido considerado um método independente, por confirmar sorologias indeterminadas e diminuir o risco de infecções transfusionais⁹.

A incorporação do NAT em bancos de sangue tem mostrado redução no risco de infecção de 1 em 2.770.000 para 1 em 5.540.000 para HIV, 1 em 670.000 para 1 em 4.400.000 para HCV e 1 em 230.000 para 1 em 620.000 para HBV¹². Ainda, segundo os autores do trabalho referenciado anteriormente, o NAT é extremamente relevante para diminuir o risco para HCV em comparação ao HIV. No entanto, foram descritos dois casos de transmissão do HIV por uma doadora de sangue adolescente (18 anos) aparentemente saudável, com história de inúmeros parceiros sexuais que se encontrava no período de janela imunológica e o mini-pool NAT não detectou¹⁴.

O Ministério da Saúde determinou a implantação do NAT para HIV e para HCV nas amostras de sangue de doadores no âmbito da Hemorrede Nacional, nos Serviços de Hemoterapia públicos, filantrópicos, privados contratados pelo SUS, e exclusivamente privados⁴, mas dois anos após esta determinação, a implantação do NAT ainda não ocorreu de forma sistemática em todo o Brasil. Apesar das discussões

em relação ao custo/benefício do NAT, os resultados são indicativos da grande importância na redução dos riscos da infecção transfusional.

Este estudo dos doadores de sangue com sorologia positiva para HIV caracterizou os marcadores sorológicos destes doadores triados no Hemocentro de Goiânia entre os anos de 2002 e 2003. Os resultados alcançados demonstraram a diminuição da frequência de bolsas com triagem positiva para HIV-1/2 e menor prevalência desta soropositividade entre os doadores que haviam doado sangue anteriormente. Dados estes que contribuem para o aumento da qualidade do sangue transfundido em nossa região, pois a taxa de descarte de bolsas não representa apenas a prevalência de uma determinada infecção na população de doadores, mas, principalmente, a qualidade do sangue e hemocomponentes disponibilizados para transfusão.

AGRADECIMENTOS

À diretoria do Hemocentro de Goiânia-Goiás e especialmente à MSc. Esther Maria de Paiva Siqueira, pelo apoio no desenvolvimento deste estudo.

À profª MSc. Luciana Alves de Oliveira do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás pelas considerações finais deste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Andrade Neto, J.L.; Pintarelli, V.L.; Felchner, P.C.Z.; Morais, R.L.; Nishimoto, F.L.. HIV prevalence among blood donors in a blood bank in Curitiba (Brazil). *Braz. J. Infect. Dis.*, v.6, n.1, p.15-21, 2002.
2. Barré-Sinoussi, F.; Chermann, J. C.; Rey, F.; Nugeyre, M.T.; Chamaret, S.; Gruest, J.; Dautet, C.; Axler-Blin, C.; Vézinet-Brun, F.; Rozioux, C.; Rozenbaum, W.; Montagnier, L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome. *Science*, v.220, p.868-871, 1983.
3. BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico, janeiro a junho de 1999.
4. BRASIL. Portaria nº 79/GM Em 31 de janeiro de 2003. O Ministro de Estado da Saúde, no uso das atribuições que lhe confere o art. 87, parágrafo único, inciso II, da Constituição, e Considerando a Meta Mobilizadora Nacional, Setor Saúde, Sangue com Garantia de Qualidade em todo seu Processo até 2003. Disponível em: <http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2003/GM/GM-79.htm>. Acesso em: 16 de jun. 2004.
5. BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico janeiro a junho de 2004. <http://www.aids.gov.br/final/dados/BOLETIM2.pdf>. Acesso em: 20 de fev. 2005.
6. BRASIL. Resolução RDC nº 153, de 14 de junho de 2004. Determina o Regulamento Técnico para os procedimentos hemoterápicos. ANVISA. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 24 jun. 2004. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=11662>. Acesso em 25 abr. 2005.
7. Carreto-Vélez, M.A.; Carrada-Bravo, T.; Martínez-Magdaleno, A. Seroprevalência de VHB, VHC e VIH em donadores de sangue em Irapuato, México. *Salud Pública Mex.*, v.45, n.5, p.5690-5693, 2003.
8. Chander, A.; Pahwa, V.K. Status of infectious disease markers among blood donors in a teaching hospital, Bhairehawa, western Nepal. *J. Commun. Dis.*, v.35, n.3, p.188-197, 2003.
9. Giachetti, C.; Linnen, J.M.; Kolk, D.P.; Dockter, J.; Gillotte-Taylor, K.; Park, M.; Ho-Sing-Loy, M.; McCormick, M.K.; Mimms, L.T.; McDonough, S.H. Highly Sensitive Multiplex Assay for Detection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Hepatitis C Virus RNA. *J. Clin. Microbiol.*, v.40, n.7, p.2408-2419, 2002.
10. Kupek, E. Transfusion Risk for Hepatitis B, Hepatitis C and HIV in the State of Santa Catarina, Brazil, 1991-2001. *Braz. J. Infect. Dis.*, v.8, n.3, p.236-240, 2004.

11. Montagnier, L. Historical essay: a history of hiv discovery. *Science*, v.298, n.5599, p.1727-1728, 2002.
12. Offergeld, R.; Faensen, D.; Ritter, S.; Hamouda, O. Human immunodeficiency virus, hepatitis C and hepatitis B infections among blood donors in Germany 2000-2002: risk of virus transmission and the impact of nucleic acid amplification testing. *Euro Surveill.*, v.10, n.2, p.13-14, 2005.
13. Otani, M.M.; Salles, N.A.; Barreto, A.M.E.; Barreto, C.C.; Chamone, D.F.; Sabino, E.C. Evaluation of the concomitant use of two different EIA tests for HIV screening in blood banks. *Rev. Panam. Salud Pública*, v.13, n.2-3, p.172-175, 2003.
14. Phelps, R.; Robbins, K.; Liberti, T.; Machuca, A.; Leparc, G.; Chamberland, M.; Kalish, M.; Hewlett, I.; Folks, T.; Lee, L.M.; McKenna, M. Window-period human immunodeficiency virus transmission to two recipients by an adolescent blood donor. *Transfusion*, v.44, n.6, p.929-33, 2004.
15. Reiche, E.M.V.; Vogler, I.H.; Morimoto, H.K.; Bortolero, A.L.; Matsuo, T.; Yuhasi, K.K.; Cancian, S.J.; Koguchi, R.S. Evaluation of surrogate markers for human immunodeficiency virus infection among blood donors at the blood bank of "Hospital Universitário Regional Norte do Paraná", Londrina, PR, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, v.45, n.1, p.23-27, 2003.
16. Sáez-Alquézar, A.; Bassit, L. Sabino, E.C. Hepatites virais. apud Ferreira, A.W.; Ávila, S.M. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 74-91.
17. Salles, N.A.; Sabino, E.C.; Barreto, C.C.; Barreto, A.M.E.; Otani, M.M.; Chamone, D.F. Descarte de bolsas de sangue e prevalência de doenças infecciosas em doadores de sangue da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo. *Rev. Panam. Salud Publica*, v.13, n.2-3, p.111-116, 2003.
18. Siqueira, E.M.P. Perfil de risco e avaliação do teste rápido para o vírus da imunodeficiência humana em voluntários do Centro de Testagem e Aconselhamento na cidade de Goiânia-Goiás. 2000. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública.
19. Stefan, L.; Rigmor, T.; Annika, K.; Madeleine, S.; Leo, F.; Ander, B.; Anders, S.; Gunnel, B.; Hans, G. Diagnosis of primary HIV-1 infection and duration of follow-up after HIV exposure. *AIDS*, v.14, n.15, p.2333-2339, 2000.
20. Szwarcwald, C.L.; Barbosa Júnior, A.; Pascom, A.R.; Souza Júnior, P.R. Pesquisa de Conhecimento, atitudes e práticas na população brasileira de 15 a 54 anos, 2004. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico Janeiro a junho de 2004, n.1, p. 18-24, 2004. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/final/dados/BOLETIM2.pdf>. Acesso em: 18 abr. 2005.
21. UNAIDS –World Health Organization. AIDS epidemic update december 2004. http://www.unaids.org/wad2004/EPI_1204_pdf_en/EpiUpdate04_en.pdf.
22. Wang, B.; Higgins, M.J.; Kleinman, S.; Schreiber, G.B.; Murphy, E.L.; Glynn, S.A.; Wright, D.J.; Nass, C.C.; Chang, D.; Busch, M.P. Comparison of demographic and donation profiles and transfusion-transmissible disease markers and risk rates in previously transfused and nontransfused blood donors. *Transfusion*, v.44, n.8, p.1243-1251, 2004.
23. Weber, B.; Gürtler, L.; Thorstenson, R.; Michl, U.; Mühlbacher, A.; Bürgisser, P.; Villaescusa, R.; Eiras, A.; Gabriel, C.; Stekel, H.; Tanprasert, S.; Oota, S.; Silvestre, M.; Marques, C.; Ladeira, M.; Rabenau, H.; Berger, A.; Schmitt, U.; Melchior, W. Multicenter Evaluation of a New Automated Fourth-Generation Human Immunodeficiency Virus Screening Assay with a Sensitive Antigen Detection Module and High Specificity. *J. Clin. Microbiol.*, v.40, n.6, p.1938-1946, 2002.
24. Zou, S.; Notari, E.P.; Stramer, S.L.; Wahab, F.; Musavi, F.; Dodd, R.Y. Patterns of age- and sex-specific prevalence of major blood-borne infections in United States blood donors, 1995 to 2002: American Red Cross blood donor study. *Transfusion*, v.44, n.11, p.1640-1647, 2004.

Endereço para correspondência:

Keila Correia de Alcântara
Rua J-60 Qd.137 Lt.28 Setor Jaó
CEP: 74674-260 Goiânia-Goiás.
e-mail: keilalcantara@yahoo.com.br

Perfil epidemiológico das infecções hospitalares na Unidade de terapia intensiva infantil do Hospital de Caridade e Beneficência de Cachoeira do Sul, RS, Brasil*

Epidemiological profile of nosocomial infections in a pediatric intensive care of Hospital de Caridade e Beneficência de Cachoeira do Sul, RS, Brazil

Vilmar Cláudio Banderó Filho¹, Cristina Ruedell Reschke² & Rosmari Hörner³

RESUMO - O objetivo deste estudo foi determinar a etiologia e a sensibilidade antimicrobiana dos agentes etiológicos isolados dos pacientes admitidos na Unidade de terapia intensiva Infantil do Hospital de Caridade e Beneficência de Cachoeira do Sul, RS, de janeiro à dezembro de 2003. Os dados foram coletados retrospectivamente das 496 amostras cultivadas nesse período. *Staphylococcus coagulase negativa* foi o patógeno mais freqüentemente isolado, seguido por *Pseudomonas spp.*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*.

PALAVRAS-CHAVE - Epidemiologia; Unidade de terapia intensiva pediátrica; sensibilidade antimicrobiana.

SUMMARY - The aim of this study were to determine the etiology and the antibacterial susceptibility of the etiological agents isolated from patients admitted to a Pediatric Intensive Care of Hospital de Caridade e Beneficência de Cachoeira do Sul, RS, from January to December 2003. Retrospective data were collected of the 496 cultivated samples in this period. Coagulase-negative *Staphylococcus* (CNS) was the most frequently pathogen isolated, followed by *Pseudomonas spp.*, *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*.

KEYWORDS - Epidemiology; Pediatric intensive care unit; susceptibility antimicrobial.

INTRODUÇÃO

Nas duas últimas décadas, observou-se um grande avanço do conhecimento médico na medicina intensiva, com modificações significativas na evolução e prognóstico dos pacientes¹. O interesse no conhecimento das alterações do perfil epidemiológico ocorrido nos últimos anos deve-se à substituição ou inclusão de novos patógenos², bem como à emergência de patógenos multirresistentes³.

As infecções nosocomiais constituem um problema de saúde pública, pois elevam o tempo de hospitalização, morbidade e mortalidade dos pacientes além dos custos no tratamento⁴. Tradicionalmente, três categorias de fatores de risco associadas à aquisição de infecções hospitalares têm sido descritas e constituem os fatores inerentes ao próprio paciente, aos procedimentos invasivos e ao ambiente hospitalar⁵.

Dentre os fatores de risco relacionados à bacteremia nosocomial em recém-nascidos podemos citar o baixo peso, imaturidade do sistema imunológico, a necessidade freqüente de procedimentos invasivos, ventilação mecânica e fatores relacionados ao ambiente e aos profissionais da saúde^{3,6,7}.

Em países em desenvolvimento os grandes levantamentos epidemiológicos são encontrados em poucos estudos. A terapia intensiva pediátrica constitui-se numa especialidade médica relativamente jovem. No Brasil, as primeiras unidades de terapia intensiva pediátrica (UTIP) foram inauguradas no Estado do Rio de Janeiro, 1971, e posteriormente em São Paulo, 1974⁸. Hoje as UTIP são reconhecidas e necessitam de autorização para funcionamento, sendo monitoradas localmente pelas Secretarias de Vigilância Sanitária Municipais, constituindo uma descentralização do Mi-

nistério da Saúde (MS) em atuação conjunta com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)⁹. Porém estudos recentes mostraram que uma porcentagem avantajada de UTIs no Brasil não possuem registro na Associação de Medicina Intensiva Brasileira (AMIB), no Conselho Regional de Medicina, na Secretaria Estadual de Saúde ou na Secretaria Municipal de Saúde, sendo unicamente localizadas através da consulta à lista telefônica. É clara a necessidade de um cadastro nacional de UTI que seja obrigatório e confiável, ou melhor, o MS já publicou uma Portaria¹⁰ tornando obrigatório este cadastramento faltando unicamente executá-la adequadamente e disponibilizar publicamente os resultados para consulta pública pela Internet. Deve-se levar em consideração que as diferentes UTIP possuem características próprias, apresentando índices diferenciados com uma faixa de variação bastante significativa¹. A terapia intensiva neonatal e pediátrica no Brasil apresentou um notável desenvolvimento nos últimos 20 anos acompanhando de certa maneira a tendência mundial. Porém, o problema no nosso país é que esse crescimento continua ocorrendo sem um planejamento estratégico adequado.

Estes fatos reforçam a necessidade do presente estudo, que objetiva conhecer o perfil epidemiológico e de sensibilidade dos microrganismos isolados nos principais materiais clínicos encaminhados para cultura, da UTI infantil (UTII) do Hospital de Caridade e Beneficência (HCB) de Cachoeira do Sul, RS, processadas no Enzilab Laboratório de Análises Clínicas. Assim procedendo, poderemos colaborar com a prevenção da resistência bacteriana, ajustando a racionalização do uso intra-hospitalar de antibióticos e a revisão dos protocolos instituídos.

Recebido em 02/09/2005

Aprovado em 27/07/2006

*Trabalho desenvolvido no Enzilab Laboratório de Análises Clínicas com a orientação do Programa de Pós-Graduação Especialização em Laboratório Clínico II

¹Farmacêutico-bioquímico do Enzilab Laboratório de Análises Clínicas, aluno do Curso de Especialização em Laboratório Clínico da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT)

²Aluna do sexto-semester de Farmácia Análises Clínicas e bolsista do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Santa Maria (LAC-HUSM)

³Professora Adjunta da disciplina de Microbiologia Clínica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM/ CCS/DACT)

MATERIAIS E MÉTODOS

Realizou-se um estudo retrospectivo, a partir do banco de dados do Enzilab, Laboratório de Análises Clínicas, computando os resultados das amostras encaminhadas para cultura, no período compreendido entre 1º de janeiro a 31 de dezembro de 2003. Foram analisados 496 exames bacteriológicos, selecionados a partir dos seguintes sítios anatómicos: ponta de catéter (central, periférico e arterial), ponta de tubo oro-traquel (TOT) e sangue de RN internados na UTI infantil do HCB de Cachoeira do Sul, RS. A coleta dos materiais foi realizada por técnicos treinados, seguindo as normas constantes nos POP's (procedimentos operacionais padrões) do laboratório. A metodologia semi-quantitativa da superfície do catéter (Método de Maki11) foi empregada para as culturas de ponta de catéter e TOT, na qual um crescimento ≥ 15 UFC/ placa é considerado significativo para infecção relacionada a catéter vascular. Nos hemocultivos, o volume de sangue foi criteriosamente seguido, por se tratar de uma das variáveis mais críticas para a positividade do exame, procurou-se seguir a proporção de no mínimo 1:5 até 1:10 de sangue e meio de cultura^{12,13}. Os microrganismos foram identificados utilizando-se metodologia convencional.

Os testes de susceptibilidade antimicrobiana foram realizados empregando a metodologia da difusão do disco em Ágar seguindo os critérios estabelecidos pelo NCCLS¹⁴.

RESULTADOS

No período de janeiro a dezembro de 2003 foram realizados no Laboratório Enzilab, exames bacteriológicos de 496 amostras clínicas provenientes da UTII do HCB, das quais 360 (72,58%) corresponderam a hemocultivos, 69 (13,91%) pontas de catéter e 67 (13,51%) pontas de TOT. Das 496 amostras cultivadas, 367 (73,99%) foram negativas, e 129 (26,01%) foram positivas. Das amostras positivas, 36 (27,91%) eram hemocultivos, 36 (27,91%) pontas de catéter e 57 (44,18%) de pontas de TOT, conforme podemos visualizar na Figura.

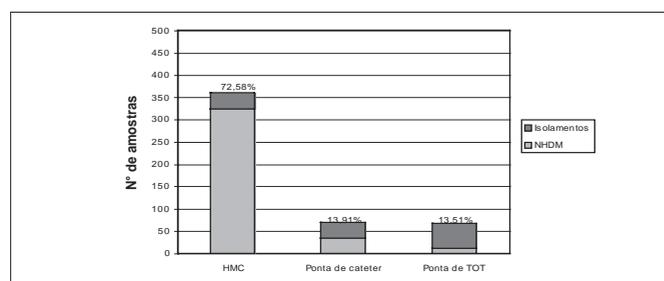


Figura I - Distribuição das amostras de acordo com o tipo de material clínico

Os isolamentos evidenciaram a presença de cocos Gram positivos em 85 (65,89%) amostras, bacilos Gram negativos em 38 (29,46%) e fungos leveduriformes em 6 (4,65%), o que está demonstrado na Figura.

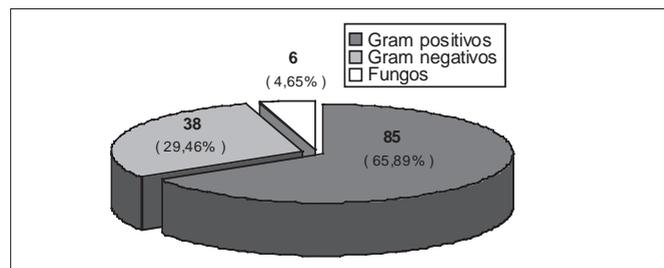


Figura II: Perfil dos microrganismos isolados das 129 amostras positivas da UTI infantil do HCB de Cachoeira do Sul, em 2003

TABELA I

Identificação dos microrganismos isolados e distribuição entre os espécimes clínicos, das 129 amostras positivas

Microrganismos	Nº de isolamentos por amostra clínica					
	Hemocultura		Ponta de Catéter		Ponta de TOT	
	N	%	N	%	N	%
Cocos Gram positivos						
<i>Staphylococcus coag neg</i>	23	63,88%	25	69,43%	27	47,38%
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	8,33%	4	11,12%	1	1,75%
<i>Streptococcus sp.</i>	0	0%	1	2,78%	0	0%
<i>Enterococcus sp.</i>	1	2,78%	0	0%	0	0%
Bacilos Gram negativos						
<i>Pseudomonas spp.</i>	1	2,78%	3	8,33%	13	22,82%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	11,12%	1	2,78%	7	12,28%
<i>Escherichia coli</i>	0	0%	0	0%	2	3,51%
<i>Enterobacter sp.</i>	1	2,78%	0	0%	1	1,75%
<i>Acinetobacter sp.</i>	0	0%	0	0%	2	3,51%
<i>Hafnia alvei</i>	0	0%	0	0%	1	1,75%
<i>Providencia sp.</i>	0	0%	0	0%	1	1,75%
<i>Serratia sp.</i>	0	0%	0	0%	1	1,75%
Fungos						
<i>Candida sp.</i>	3	8,33%	2	5,56%	1	1,75%
Total	36	100%	36	100%	57	100%

A identificação dos microrganismos isolados é representada na Tabela I, onde podemos visualizá-los agrupados em cocos Gram positivos, bacilos Gram negativos e fungos. Entre os cocos Gram positivos, 27 (31,77%) foram isolados de hemocultivos, 30 (35,29%) de pontas de catéter e 28 (32,94%) de pontas de TOT. Os gêneros identificados foram *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus*. Entre os bacilos Gram negativos 6 (15,79%) foram isolados de hemocultivos, 4 (10,52%) de pontas de catéter e 28 (73,69%) de pontas de TOT. Das leveduras de *Candida*, 3 (50) foram isoladas de hemocultivos, 2 (33,33%) de pontas de catéter e 1 (16,67%) de TOT.

TABELA II

IPorcentagens de sensibilidade de SCN e *S. aureus* frente aos principais antimicrobianos utilizados no HCB

Antimicrobianos	SCN (%)	<i>S. aureus</i> (%)
Oxacilina	25	50
Ciprofloxacina	65,96	100
Levofloxacina	78,26	100
Vancomicina	100	100

TABELA III

Porcentagens de sensibilidade de *Pseudomonas sp.* e *K. pneumoniae* frente aos principais antimicrobianos utilizados no HCB

Antimicrobianos	<i>Pseudomonas sp.</i> (%)	<i>K. pneumoniae</i> (%)
Amicacina	94,12	7,69
Ciprofloxacina	100	100
Gentamicina	58,82	0
Tobramicina	93,75	0
Polimixina	100	100
Cefepima	100	100
Ceftazidima	100	33,33
Levofloxacina	100	100
Imipenem	33,33	50

Com referência aos perfis de sensibilidade/resistência, podemos visualizar nas Tabelas II e III, as porcentagens de sensibilidade apresentadas pelos microrganismos mais frequentemente isolados nas culturas desse estudo, frente à antimicrobianos selecionados, respectivamente em ordem de prevalência, *Staphylococcus coagulase negativa* (SCN), *Pseudomonas sp.*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*. Como mostra a Tabela II, entre os cocos Gram positivos mais isolados no HCB, não foi detectada nenhuma resistência para o antimicrobiano vancomicina,. Entre as quinolonas, as cepas de *S. aureus* e SCN apresentaram maior sensibilidade

frente à levofloxacina, apresentando respectivamente 100% e 78,26 %, contra os igualmente 100 % e 65,96 % de suscetibilidade em relação à ciprofloxacina.

Na tabela III podemos conferir que as cepas de *Pseudomonas* sp. e *K. pneumoniae* apresentaram 100 % de sensibilidade frente à ciprofloxacina, polimixina, cefepima e levofloxacina. A *Pseudomonas* sp. apresentou igualmente 100 % de sensibilidade frente à ceftazidima.

DISCUSSÃO

Atualmente, devido ao alto nível de tecnologia empregado nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI) temos como consequência o prolongamento da sobrevida dos pacientes, mesmo os que se encontram em situação muito adversa. Porém, por outro lado, contamos com o ônus do aumento do risco de Infecção Hospitalar (IH) nesses pacientes críticos. Diversos estudos revelam que as IHS representam as mais freqüentes complicações do tratamento em UTIs¹⁵. Segundo Pedrosa e Couto¹⁶, no Brasil, os leitos destinados para a terapia intensiva representam menos de 2% dos leitos hospitalares disponíveis, porém eles contribuem com mais de 25% das infecções hospitalares, com significativo impacto nos índices de morbidade e mortalidade. Este tipo de clientela admitida na UTI, apresenta doenças ou condições clínicas predisponentes a infecções. Muitos deles já se encontram infectados ao serem admitidos na unidade, e a absoluta maioria é submetida a procedimentos invasivos ou imunossupressivos com finalidades diagnóstica ou terapêutica. A resposta do paciente frente ao processo infeccioso é deficiente, pois os mecanismos de defesa estão comprometidos tanto pela doença quanto pelas intervenções sofridas, necessárias ao tratamento/diagnóstico.

A UTII do HCB constitui-se em uma unidade de terapia intensiva mista, com leitos neonatais e pediátricos, perfil este que se assemelha com os estudos realizados por Souza *et al.*⁸ na cidade de São Paulo (SP – Brasil), onde 52% das unidades são mistas. A referida UTI dispõe de 8 leitos, sendo que a maior parte de sua clientela, na admissão, encontra-se na faixa etária de 1 a 28 dias, atuando mais como UTI neonatal. No ano de 2003 foram internados 195 pacientes nesta unidade, tendo uma taxa de ocupação média, de 69%. Dados da literatura relatam que as diferentes UTIs pediátricas possuem características próprias, com índices de mortalidade distintos e com amplas variações, que vão de 3 a 30%¹. Não dispomos dos dados referente à mortalidade na nossa UTI. Os maiores fatores de risco que contribuem para a mortalidade na UTI I do HCB foram identificados pelos intensivistas que trabalham neste nosocômico, como sendo a faixa etária inferior a 2 meses, a admissão na unidade por patologia clínica, a utilização de dois ou mais antibióticos, necessidade de procedimentos invasivos e o uso de ventilação mecânica, coincidindo com os estudos realizados no México por Gemke *et al.*¹⁷. É sabido que o sistema imunológico é menos eficiente durante os primeiros doze meses de vida, estando portanto essas crianças mais suscetíveis a contrair infecções agudas com complicações sistêmicas.

Os resultados totais das nossas culturas revelaram que SCN e *S. aureus* são os microrganismos predominantes em bacteriemias relacionadas com catéter intravascular. Estas bactérias se relacionam com os cuidados de assepsia utilizados no procedimento de colocação dos catéteres e ao tempo de permanência, com vasta discussão à respeito, uma vez que se considera a pele como a fonte mais comum destes dois microrganismos que causam as infecções rela-

cionadas a catéteres. Estes resultados estão de acordo com a literatura¹⁸. O aumento do isolamento de SCN nas infecções denota falha na anti-sepsia que precedem aos procedimentos invasivos. Porém, esses mesmos SCN constituem a maior causa de bacteriemia adquirida no ambiente hospitalar, na maioria dos casos em pacientes mantidos em unidades de tratamento intensivo e UTI neonatal⁷. Alguns autores têm demonstrado a importância do *S. aureus* como agente etiológico de endocardite infecciosa em adultos e crianças, especialmente no período neonatal¹⁹. Os outros dois agentes etiológicos mais prevalentes no nosso estudo foram a *Pseudomonas* sp. e a *Klebsiella pneumoniae*.

Estas duas bactérias têm sido identificadas como colonizantes em crianças submetidas à ventilação mecânica, em unidades de tratamento intensivo²⁰ sendo freqüentemente isoladas em culturas de secreções traqueais de pacientes com pneumonia associada à ventilador e são citados como os microrganismos encapsulados prevalentes em determinada epidemia ocorrida em Mérida (Yucatã) nos pacientes submetidos à ventilação mecânica²¹. A pneumonia nosocomial corresponde a 24 % das infecções em UTI, sendo 58% delas relacionadas à ventilação mecânica¹⁵.

Em relação à suscetibilidade antimicrobiana, não foi encontrado nenhum microrganismo Gram positivo resistente à vancomicina e todos os *S. aureus* isolados nessa unidade (UTI I) foram sensíveis à ciprofloxacina. Porém, 50% dos *S. aureus* isolados foram resistentes à oxacilina (MRSA), sendo que num estudo de vigilância efetuado nos hospitais brasileiros, esse número ficou na faixa geral de 34%²². A sensibilidade à oxacilina dos SCN encontrada nesse nosocômio de 25%, foi parecida à encontrada em outros hospitais de nosso país, onde as cepas deste microrganismo possuem uma sensibilidade menor do que 20%²². *Pseudomonas* sp., o bacilo Gram negativo não fermentador (BGN-NF) mais prevalente, apresentou uma ótima sensibilidade frente à ciprofloxacina, levofloxacina, ceftazidima e cefepima, para todas as cepas isoladas, porém, a resistência ao redor de 67% encontrada, ao imipenem é preocupante, comparado com outros estudos realizados no Brasil^{22,23}. Sensibilidade na faixa de 25% a 66% foram relatadas em infecções do trato urinário, ficando em níveis superiores a 50% em sítios correlatos aos analisados²².

CONCLUSÃO

O estudo do perfil etiológico e dos padrões de sensibilidade encontrados na Unidade de Terapia Intensiva Infantil do HCB nos faz concordar que a freqüência dos patógenos e os padrões de resistência podem variar significativamente de país para país e em diferentes hospitais num mesmo país²². Os pacientes dessas unidades são de maior risco, nos quais, a freqüente e inevitável aplicação de procedimentos invasivos e a administração de antibióticos de amplo espectro leva à seleção de microrganismos multirresistentes. Portanto há necessidade de um planejamento e implementação de protocolos bem estabelecidos, com tomadas de decisões conjuntas entre a área médica e paramédica nesse tipo de unidade hospitalar, com sessões clínicas periódicas e investimentos na capacitação profissional para prevenir e controlar a infecção e a resistência bacteriana.

REFERÊNCIAS

1. Einloft, P.R.; Garcia, P.C.; Piva, J.P.; Bruno, F.; Kipper, D.J.; Fiori, R.M. Perfil epidemiológico de dezesseis anos de uma unidade de terapia intensiva pediátrica. Rev. Saúde Pública, 36(6): 728 -733, 2002.

2. Meneghetti, B.H.; Salla, A.; Dal Forno, N.L.; Oliveira, L.T.; Righi, R.; Alves, S.H. Epidemiologia das infecções bacterianas e fúngicas diagnosticada através de hemocultivos, no Hospital Universitário de Santa Maria – HUSM, RS. RBAC, 36(3): 173 -175, 2004.
3. Menezes, E.A.; Macedo, F.V.V.; Cunha, F.A.; Andrade, M.S.S.; Rocha, M.V.A.P. Perfil de infecção e resistência aos antimicrobianos de bacilos Gram Negativos Não Fermentadores isolados no Laboratório de Patologia Clínica Dr. Edilson Gurgel, Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza – CE. RBAC, 36(4): 209 – 212, 2004.
4. De Moraes, B.A.; Cravo, C.A.N.; Loureiro, M.M.; Solari, C.A.; Asensi, M.D. Epidemiological analysis of bacterial strains involved in hospital infection in a University Hospital from Brazil. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 42(4): 201 – 207, 2000.
5. Arantes, A.; Carvalho, E.S.; Medeiros, E.A.S.; Farhat, C.K.; Mantese, O.C. Uso de diagramas de controle na vigilância epidemiológica das infecções hospitalares. Rev. Saúde Pública, 37(6): 768 – 774, 2003.
6. Andrade, D.; Angerami, E.L.S.; Padovani, C.R. Condição microbiológica dos leitos hospitalares antes e depois de sua limpeza. Rev. Saúde Pública, 34(2): 163 – 169, 2000.
7. Cunha, M.L.R.S.; Lopes, C.A.M. Estudo da produção de β -lactamase e sensibilidade às drogas em linhagens de estafilococos coagulase-negativos isolados de recém-nascidos. J. Bras. de Patol. e Med. Laboratorial, 38(4): 281 – 290, 2002.
8. Souza, D.C.; Troster, E.J.; Carvalho, W.B. *et al.* Disponibilidades de unidades de terapia intensiva pediátrica e neonatal no município de São Paulo. J. Pediatr., 80(6): 453-460, 2004.
9. Barbosa, A.P. Terapia intensiva neonatal e pediátrica no Brasil: o ideal, o real e o possível. J. Pediatr, 80(6): 437-438, 2004.
10. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Portaria No. 511, de 29/12/2000. D.ºU. – Diário Oficial da União; Poder executivo, de 19/06/2001.
11. Maki, D.G.; Weise, C.E.; Sarafin, H.W.A. Semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter related infection. N. Engl. J. Med. 29: 1305-1309, 1977.
12. Oplustil, C.P.; Zoccoli, C.M.; Tobouti, N.R. Sinto, S.I. Hemocultura. In: Procedimentos básicos em microbiologia clínica. 2ª ed. São Paulo: SARVIER, p. 126-135, 2004.
13. Reimer, L. G.; Wilson, M. L.; Weinstein, M. P. Update on detection of bacteremia and Fungemia. Clin. Microbiol. Rev.10(3): 444-465, 1997.
14. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Fourteenth Informational Supplement - M100-S14. NCCLS, v. 24, n. 1, 2004.
15. Pereira, M.S.; Prado, M.A., Souza, J.T. *et al* Cnortole de Infecção Hospitalar em Unidade de Terapia Intensiva: desafios e perspectivas. Ver Eletrônica de Enfermagem – v.2, n.1, out-dez. 2000. Disponível no site: <http://www.fen.ufg.br/revista>.
16. Pedrosa, T.M.G. & Couto, R.C. Prevenção de Infecção em Terapia Intensiva de Adultos e Pediátrica. In: Infecção Hospitalar: epidemiologia e controle. Belo Horizonte: MEDSI, p.527, 1999.
17. Gemke, R.J.; Bonsel, G.J.; Van Vught, A. J. Effectiveness and efficiency of a Dutch pediatric intensive care unit: validity and application of the pediatric risk of mortality score. Crit Care Med 22: 1477-1484, 1994.
18. Aguilar, G.M.; Arriaga, M.C.ª Incidência de bacteriemia y neumonia nosocomial em uma unidad de pediatria. Salud Pública de México, 43: 515-522, 2001.
19. Watanakunakorn, C; Burkert, T. Infective Endocarditis nat a Large Community Teaching Hospital, 1980-1990. A review of 210 epidodes. Medicine, 72(2): 90-102,1993.
20. Miranda, N.G.; Gadea, A.T.; Leães, .. *et al.* Cultivos endobronquiales em niños con asistencia ventilatoria mecânica en una unidade de terapia intensiva. In: Memórias VIII Reunión Nacional de Investigación Médica, México, D.F.: IMSS, 1999; (resumem No. 86).
21. Zaidi, M.; Martín G.; Rosado, R. Epidemia de neumonia asociada a ventilación mecânica em Mérida, Yucatan. Salud Publica Mex. 41: 38-43, 1999.
22. Sader, H.S.; Gales, A.C.; Pfaller, M.A.; *et al.* Taphogen frequency ande resistance patters in Brazilizn hospitals: summary of results from three years of the SENTRY antimicrobial surveillance program, 5(4); 200-214, 2001.
23. Santos, L; Santos, I.B. Assis, A.M.L. Xavier, D.E. Determinação da produção de metalo-beta-lactamases em amostras de Pseudomonas aeruginosa isoladas em João Pessoa, Paraíba. J Brás Patol Med Lab. 38(4): 291-296, 2002.

Endereço para correspondência:

Rosmari Hörner (autora responsável pela publicação)
 Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
 Centro de Ciências da Saúde –
 Universidade Federal de Santa Maria
 Santa Maria RS – CEP: 97110-970
 Telefone: (55)-220-8464
 e-mail: rosmari@smail.ufsm.br

IFCC WORLDLAB Fortaleza - Brasil

**20º Congresso Internacional de Bioquímica e Medicina Laboratorial
 35º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas
 8º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica**

28 de setembro - 2 outubro/2008

Local:
Centro de Convenções do Ceará

Análise da incidência de parasitoses intestinais no município de Paraíba do Sul, RJ

Analysis of intestinal parasites incidence in the city of Paraíba do Sul, RJ

Sarah Carvalho Baptista¹, Júlia Maria Mendonça Breguez¹, Manoel Carlos Pereira Baptista²,
Gilberto Marcelo Sperandio da Silva³ & Roberta Olmo Pinheiro³

RESUMO - A análise da incidência de parasitas intestinais na cidade de Paraíba do Sul (RJ) foi avaliada tendo por base amostras obtidas de pacientes do Laboratório Neolab, no período compreendido entre 1999 e 2004. No total, foram realizados 2157 exames e 11,54% das amostras foram positivas para ao menos um parasita. Os protozoários *Endolimax nana*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba coli* e os helmintos *Strongyloides stercoralis* e *Ascaris lumbricoides* foram os parasitos mais frequentemente encontrados, correspondendo a 81,2% das amostras positivas. Desse modo, ao realizar um levantamento epidemiológico das parasitoses intestinais no município de Paraíba do Sul, espera-se contribuir para a determinação de políticas de controle das doenças parasitárias neste município.

PALAVRAS-CHAVE - Parasitas intestinais

SUMMARY - Intestinal parasites incidence in the city of Paraíba do Sul was investigated by means of the analyses of samples obtained from patients in Neolab Laboratory between 1999 and 2004. On the whole, 2157 tests were performed, and 11,54% of the samples were tested positive for at least one parasite. The protozoan parasites *Endolimax nana*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba coli* and the helminthes *Strongyloides stercoralis* and *Ascaris lumbricoides* were the most frequent parasites found, corresponding to 81,2% of the positive samples. Thus, using this epidemiological approach to intestinal parasites in the city of Paraíba do Sul we expect to contribute to determining strategies to control parasite diseases in that city.

KEYWORDS - intestinal parasites

INTRODUÇÃO

As parasitoses intestinais são doenças cujos agentes etiológicos são helmintos ou protozoários, os quais, em pelo menos uma das fases do ciclo evolutivo, localizam-se no aparelho digestivo do homem, podendo provocar diversas alterações patológicas⁴. No Brasil, as enteroparasitoses constituem um sério problema de saúde pública devido ao difícil acesso ao saneamento básico e à educação pela população mais carente, já que a transmissão desses agentes está diretamente relacionada com as condições de vida e de higiene da população¹⁵. As helmintoses com maior incidência em humanos são: Ascariíase, Tricuríase, Enterobiose, Ancilostomose e Estrongiloidíase. Dentre as protozooses destacam-se, pela sua importância na infância, a Giardiase e a Amebíase³. Há de se considerar que, além da melhoria das condições sócio-econômicas e da infra-estrutura geral, é necessário, também, o engajamento comunitário que é um dos aspectos fundamentais para implantação, desenvolvimento e sucesso dos programas de controle³. Este trabalho tem como objetivo relatar a incidência de enteroparasitoses no município de Paraíba do Sul (RJ), no período de 1999 à 2004.

MATERIAL E MÉTODOS

As estimativas referentes à incidência das enteroparasitoses na população de Paraíba do Sul foram calculadas a partir de exames realizados no Neolab – Laboratório de Análises Clínicas, entre os anos de 1999 e 2004. No município de Paraíba do Sul, há um laboratório público que atende à aproximadamente 50% da população e dois outros laboratórios privados, entre eles o Neolab. Estima-se que cerca de 10-20% da população do município seja atendida no Neolab. As amostras fecais foram analisadas pelos métodos de Ritchie e Faust. Todos os exames foram realizados simultaneamente

utilizando os dois métodos acima citados, sendo que 32,73% das amostras foram coletadas durante três dias com conservante MIF (quando solicitado pelo médico) e o restante das amostras eram fezes sem conservante. As variáveis do estudo correspondem à espécie parasitária, sexo e idade dos clientes do Neolab. A análise de significância estatística foi realizada através do teste χ^2 (Qui-quadrado) admitindo-se a significância estatística de 95% e 99%.

RESULTADOS

Foram realizados 2157 exames no período de 1999 a 2004. Os dados obtidos demonstraram que 11,54% dos clientes albergaram cistos ou ovos de pelo menos uma espécie de parasita intestinal e entre estes, 16,73% apresentaram poliparasitismo. Os protozoários *Endolimax nana*, *Giardia lamblia* e *Entamoeba coli* e os helmintos *Strongyloides stercoralis* e *Ascaris lumbricoides* foram os parasitos mais frequentemente encontrados nas fezes, juntos correspondendo a 81,2% das amostras positivas (Tabela 1). Foi observada a predominância de material proveniente de pacientes do sexo feminino (60,5%); porém, uma maior incidência de parasitoses foi observada no sexo masculino (Fig. 1). A incidência de *Giardia lamblia*, *Strongyloides stercoralis* e *Endolimax nana* foi maior no sexo masculino. Com relação aos demais parasitos encontrados, não houve diferença com relação à incidência por sexo (Fig. 2). As faixas etárias com maior positividade foram as de 0 a 10 anos, 30 a 40 anos e maior de 51 anos. Na análise individual das parasitoses mais frequentes foi observada que na faixa etária de 0 a 10 anos, a prevalência de *Giardia lamblia* significativamente maior que nos outros grupos etários; que *Endolimax nana* foi encontrada em maior quantidade na faixa de 30 a 40 anos e que *Strongyloides stercoralis* teve maior prevalência na faixa etária maior que 51 anos (Tabela 2).

Recebido em 21/07/2005
Aprovado em 25/04/2006

¹Discentes do curso de Farmácia e Bioquímica da Universidade Severino Sombra/RJ (USS)

²Farmacêutico-Bioquímico do Laboratório Neolab – Paraíba do Sul/RJ

³Docentes do curso de Farmácia e Bioquímica da USS.

TABELA I

Ocorrência de parasitoses intestinais no município de Paraíba do Sul (1999-2004).

Parasitas encontrados	Número de casos	Ocorrência (%)
<i>Endolimax nana</i>	60	23,9
<i>Giardia lamblia</i>	58	23,1
<i>Entamoeba coli</i>	49	19,5
<i>Strongyloides stercoralis</i>	22	8,8
<i>Ascaris lumbricoides</i>	15	5,9
Ancilostomídeos	12	4,8
<i>Entamoeba histolytica</i>	10	4,0
<i>Trichuris trichuria</i>	9	3,6
<i>Taenia</i> sp	5	2,0
<i>Iodamoeba bustchilli</i>	5	2,0
<i>Chilomastix musnili</i>	3	1,2
<i>Enterobium vermicularis</i>	3	1,2

TABELA II

Ocorrência de parasitoses intestinais no município de Paraíba do Sul de acordo com a Faixa etária.

Faixa etária	0-10	11-20	21-30	31-40	41-50	≥ 51	Total
<i>Endolimax nana</i>	9	5	9	18	5	14	60
<i>Giardia lamblia</i>	22	5	7	9	7	9	58
<i>Entamoeba coli</i>	12	5	10	11	1	10	49
<i>Strongyloides stercoralis</i>	5	1	1	1	3	11	22
<i>Ascaris lumbricoides</i>	4	2	2	1	2	4	15
Ancilostomídeos	3	4	2	1	1	1	12
<i>Entamoeba histolytica</i>	1	0	5	1	1	3	10
<i>Trichuris trichuria</i>	3	1	2	2	0	1	9
<i>Taenia</i> sp	1	0	0	2	0	2	5
<i>Iodamoeba bustchilli</i>	1	1	1	2	0	0	5
<i>Chilomastix musnili</i>	0	0	0	1	0	2	3
<i>Enterobium vermicularis</i>	1	0	0	1	0	1	3
Total	62	24	39	50	20	58	...

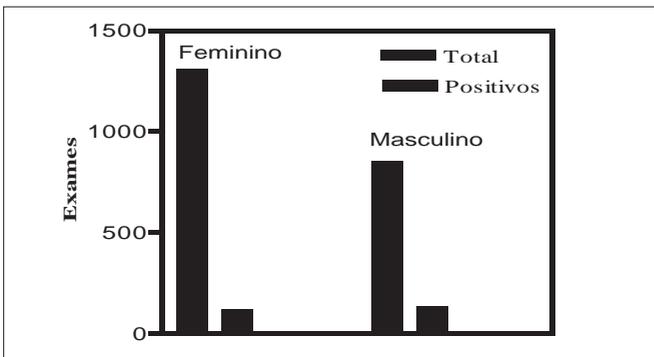


Figura 1 – Ocorrência de parasitas intestinais de acordo com o sexo dos pacientes do Laboratório Neolab.

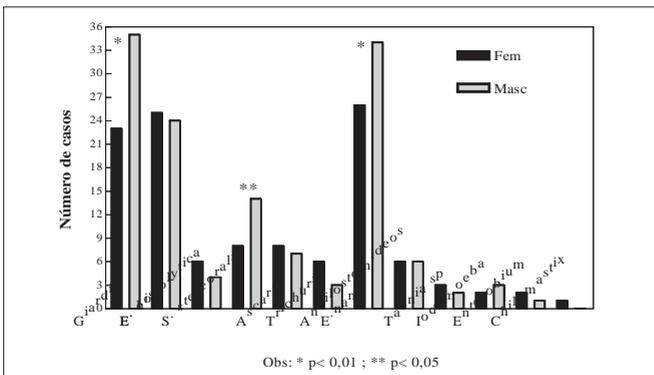


Figura 2 – Distribuição dos parasitas por sexo dos entrevistados

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A análise dos exames realizados no período compreendido entre 1999-2004 descreveu a frequência e a distribuição das enteroparasitoses dentre a população de Paraíba do Sul, RJ. Foi observada menor incidência de *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura* em relação à *Giardia lamblia*. Não se sabe se tal incidência ocorreu pelo baixo número de indivíduos contaminados ou porque os ovos de *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura* requerem um período de maturação de pelo menos três semanas em solo úmido e sombreado antes de se tornarem infectantes e os cistos de *Giardia* já serem infectantes no momento de sua eliminação pelas fezes. Essa última condição permite a transmissão interpessoal da parasitose, comum mesmo em ambientes saneados. Surto de giardíase não são raros em países desenvolvidos, especialmente em creches e populações institucionais¹², estimando-se que, em diferentes áreas dos Estados Unidos, a prevalência de giardíase na população geral oscile entre 2 e 20%².

A prevalência de *Trichuris trichiura* foi expressivamente menor do que a observada em outros estudos, como em um levantamento por amostragem realizado na cidade de São Paulo⁹, na qual foi observada a frequência de 12,6% e em um trabalho desenvolvido no distrito de Botucatu, que demonstrou a frequência 17,3%, podendo inferir que há possibilidade deste parasito estar sendo laboratorialmente sub-diagnosticado¹⁴.

O predomínio da giardíase sobre as demais enteroparasitoses, como foi observado dentre as crianças de 0 a 10 anos, coincide com o que vem sendo descrito em inquéritos realizados em algumas populações infantis de São Paulo^{5,6,10,16} e com diagnóstico realizado entre os usuários da rede básica de serviços de saúde da região metropolitana de São Paulo¹⁷.

Diferentes autores^{4,11} realizaram trabalhos de estudo sobre a frequência de enteroparasitoses em diferentes faixas etárias, determinando que a faixa com índices mais elevados é a de 5 a 12 anos, situação muito semelhante à verificada no presente inquérito, no qual as maiores incidências foram observadas de 0 a 10 anos. As crianças estão mais susceptíveis à contaminação em função do desconhecimento dos princípios básicos de higiene e da maior exposição aos agentes etiológicos a partir do intenso contato com o solo, que funciona como um referencial lúdico em torno do qual desenvolvem uma série de brincadeiras. Estima-se, para uma série de parasitas, particularmente *Ascaris lumbricoides*, que o decréscimo na ocorrência com o passar da idade, ou seja, as baixas taxas de incidência e prevalência em adultos estariam condicionadas não só à mudança de hábitos de higiene mas, também, ao desenvolvimento de imunidade progressiva e duradoura contra tais parasitos.

Foi observada uma diferença importante em relação à frequência de *Strongyloides stercoralis* na faixa etária acima de 51 anos; porém, estudos epidemiológicos evidenciam o predomínio dessa doença na faixa etária de 0 a 15 anos. Tal diferença pode ser explicada porque a maioria dos trabalhos não utilizou métodos específicos para detecção de larvas, além de ser difícil a comparação devido à diversidade de técnicas empregadas, podendo, por isso, ser diagnosticado um resultado falso negativo e a diminuição das faixas etárias atingidas. O município de Paraíba do Sul não possui grande número de edificações e grande parte da população mora em casas com quintais, hortas e cultivo de plantas. É provável que essa maior incidência na faixa etária acima dos 51 anos seja decorrência do fato dessas pessoas

andarem descalçadas, estando assim em contato freqüente com o solo, mais susceptíveis a esse parasito.

A presença de *Endolimax nana* no material fecal foi encontrada com maior freqüência na faixa etária de 31 a 40 anos. O encontro de *E. nana* e *E. coli* são indicadores de baixas condições de higiene e contaminação fecal¹³.

Em relação ao sexo, já foi relatado em alguns trabalhos a maior prevalência de parasitoses intestinais no sexo masculino, mas parece não haver nenhuma relação com fatores de predisposição^{7, 8}.

O presente trabalho apresenta um viés, na medida em que o estudo foi realizado com pacientes que procuram a rede privada de atendimento; no entanto, a continuidade desses trabalhos epidemiológicos pela comunidade científica é essencial para que haja conscientização de que é necessária uma maior ação de controle das doenças parasitárias e para o desenvolvimento de estratégias que levem à erradicação das mesmas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenadoria de Pesquisa da Universidade Severino Sombra (USS), ao Curso de Farmácia da USS e aos dirigentes do Neolab Laboratório de Análises Clínicas.

REFERÊNCIAS

1. CHIEFFI, P. P.; WALDMAN, C. C. S.; SAKATA, E. E.; GERBI, L. J.; ROCHA, A. B.; AGUIAR, P. R.; Aspectos epidemiológicos das enteroparasitoses no Estado de São Paulo, Brasil. *Revista Paulista de Medicina*, 99: 34-36, 1982.
2. CRAUN, G. F.; Waterborn giardiasis. In: MEYER, E. A.; editors. *Giardiasis*. Amsterdam, Elsevier; 1990.
3. DA SILVA, C. G.; DOS SANTOS, H. A.; Ocorrência de parasitoses intestinais da área de abrangência do Centro de Saúde Cícero Idelfonso da Regional Oeste da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte, Minas Gerais. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, 1(1), 2001.
4. FERREIRA, J. R.; VOLPATO, F.; CARRICONDO, F. M.; MARTINICHEN, J. C.; LERNARTOVICZ, V.; Diagnóstico e prevenção de parasitoses no reassentamento São Francisco, em Cascavel – PR. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 36 (3): 145-146, 2004.
5. FERREIRA, M. U.; FERREIRA, C. S.; MONTEIRO. Tendência secular das parasitoses na infância na cidade de São Paulo (1984-1996). *Revista de Saúde Pública* 2000;34(6 Supl):73-82.
6. HIRSCHFELD, M. P. M.; KANAMURA, H. Y.; CURY, A. E.; MINAMI, P. S.; Prevalência de enteroparasitoses em crianças atendidas no Centro de Saúde Butantã. (São Paulo, SP). *Rev Soc Bras Med Trop*, 25: 60, 1993.
7. LIMA, G. M.; COTRIN, G. S.; Enteroparasitoses: prevalência nos alunos da Escola Estadual de Carneirinho – MG. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*,

36(4): 231-233, 2004.

8. MACHADO, R. C.; MARCARI, E. L.; CRISTANTE, S. F. V.; CARARETO, C. M. A. Giardíase e helmintíase em crianças de creches e escolas de 1º e 2º graus (públicas e privadas) da cidade de Mirassol (SP, Brasil). – *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 32(6): 697-704, 1999.
9. MARTINI, A. S.; RODRIGUES, V. C.; TABA, M. R. M.; FUJIMORI, C.; Avaliação da presença de enteroparasitoses em crianças de um centro de convivência infantil. *Revista da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto*, 22: 17-20, 1985.
10. NUSSENZWEIG, I.; NATALE, A.; MALHEIRO, M. E. N.; MALACO, M. M. L.; Prevalência de anemia e parasitoses intestinais em escolas do município de São Paulo. Resultados do emprego da merenda escolar e de drogas antiparasitárias. *Rev Paul Med*, 100:9-32, 1982.
11. PEDAZZANI, E. S.; MELLO, D. A.; PRIPAS, S.; FUCCI, M.; BARBOSA, C. C. A.; SANTORO, M. C. M.; Helmintoses intestinais. III - II – Prevalência e correlação com renda, tamanho da família, anemia e estado nutricional. *Revista de Saúde Pública*, 22: 384-389, 1988.
12. PICKERING, L. K.; ENGELKRIK, P. G.; Giardiasis among children in day care centers. In: MEYER, E. A.; editors. *Giardiasis*. Amsterdam, Elsevier; 1990. (267-93).
13. PUPULIN, A. R. T.; GOMES, M. L.; DIAS, M. L. G. G.; ARAÚJO, S. M.; GUILHERME, A. L. F.; KUHLE, J. B. Giardíase em creches do município de Maringá, PR. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 36(3): 147-49, 2004.
14. SALATA, E.; CORRÊA, F. M. A.; SOGAYAR, M. I. L.; BARBOSA, M. A. Inquérito parasitológico Cecap, Distrito-sede de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 103: 308-312, 1985.
15. SANTOS, R. C. V.; HOERLE, J. L.; AQUINO, A. R. C.; DE CARLI, G. A. Prevalência de enteroparasitoses em pacientes ambulatoriais do Hospital Divina Providência de Porto Alegre, RS. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 36(4): 241-243, 2004.
16. TORRES, D. M.; CHIEFFI, P. P.; COSTA, W. A.; KUDZIELICIS, E.; Giardíase em creches mantidas pela prefeitura de São Paulo, 1982/83. *Rev Inst Med Trop São Paulo*; 35: 10-55, 1993.
17. WALDMAN, E. A.; CHIEFFI, P. P.; Enteroparasitoses no Estado de São Paulo: questão de saúde pública. *Rev Inst Adolfo Lutz*; 49: 93-9, 1989.

Endereço para correspondência:

Autor responsável:

Dra. Roberta Olmo Pinheiro

Professora Adjunta – Universidade Severino Sombra

Coordenadoria de Pesquisa

Rua Dr. Fernandes Júnior 89

CEP: 27700-000 Centro – Vassouras – RJ

Email: roberta@biof.ufrj.br

robertaolmo@yahoo.com.br

Tel: (24) 2471-8200

IFCC WORLDBLAB

Fortaleza - Brasil

20º Congresso Internacional de Bioquímica e Medicina Laboratorial

35º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas

8º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica

28 de setembro - 2 outubro/2008

Local:

Centro de Convenções do Ceará

HISTOPLASMOSE CLÁSSICA: REVISÃO*

CLASSIC HSITOPLASMOSIS: REVIEW

Thais Ferrarelli Rossini¹ & Letícia Silveira Goulart²

RESUMO - A histoplasmose clássica é uma infecção micótica causada pelo fungo dimórfico *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, fungo que se apresenta em duas formas morfológicas: uma miceliar, presente no solo e uma leveduriforme, presente no hospedeiro. A forma miceliar produz hifas septadas hialinas e conídios. O *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* é encontrado em fezes de aves e morcegos, cavernas, árvores ocas, construções antigas e sótãos, sendo estes, fontes importantes de infecção. A infecção ocorre quando o micélio composto de hifas e conídios se torna aerolizado por alterações físicas e são inalados. Nos pulmões, os fragmentos de hifas e conídios diferenciam-se em leveduras que sobrevivem e se proliferam no interior de macrófagos. As formas clínicas incluem a infecção assintomática (forma mais comum), infecção pulmonar aguda, histoplasmose disseminada e histoplasmose pulmonar crônica. A incidência da histoplasmose tem aumentado dramaticamente, principalmente como resultado de alterações do sistema imune associadas com transplantes de órgãos e medula, SIDA ou quimioterapia. O diagnóstico laboratorial baseia-se no exame direto, cultura, provas sorológicas e reação intradérmica.

PALAVRAS-CHAVE - Histoplasmose, histoplasmina e *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*.

SUMMARY - Classic histoplasmosis is a micotic infection caused by dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, this fungus exists in two morphological forms: a mycelial form in soil and a yeast form in the host. The mycelial form produces hifas septadas hialinas and conidia. *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* is found in excrements of birds and bats, hollow caves, trees, old constructions and attics, being these important sources of infection. The infections occur when mycelia become aerosolized by physical perturbation and are inhaled. Within the lung, hyphal fragments and conidia differentiate into yeasts that survive and proliferate within alveolar macrophages. The clinical forms can be asymptomatic infection (most common form), acute pulmonary infection, disseminated histoplasmosis and pulmonary chronic histoplasmosis. In recent decades, the incidence of histoplasmosis has increased dramatically, mainly as the result of immune status alterations associated with organ or bone marrow transplantation, AIDS, or cancer chemotherapy. The laboratorial diagnosis is based on the direct examination, culture, serological tests and intradermal reaction.

KEYWORDS - Histoplasmosis, histoplasmin and *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*.

INTRODUÇÃO

A histoplasmose clássica (Doença de Darling, Citomicrose Reticular – Endotelial de Humphrey, Doença das Cavernas) é uma infecção micótica causada pelo fungo dimórfico *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, que apresenta especial afinidade patogênica ao Sistema Reticular Endotelial (S.R.E.). É uma micose endêmica nos Estados Unidos, América Latina, parte da Ásia e África. Podemos denominar essa infecção como "micose do futuro", pois o número de casos tende a aumentar, à medida que se pensa em tais processos^{4, 10, 12, 13, 21}.

O *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* é um fungo saprófita do solo, que cresce na forma miceliar a temperatura de 25°C, em associação com solos úmidos contendo elevados teores de nitrogênio. O fungo tem sido encontrado em dejetos de aves e morcegos, cavernas, árvores ocas, construções antigas e sótãos, sendo estes, fontes importantes de infecção e, além disso, a própria movimentação do solo proporciona o transporte de esporos pelo ar^{2, 6, 10, 24}.

O contágio por este fungo se dá através da inalação de esporos, desenvolvendo-se a primoinfecção no pulmão. Na maioria dos indivíduos, esta forma clínica é benigna, passando despercebida ou com sintomas semelhantes à uma infecção viral, do tipo resfriado comum. Como seqüelas, podem ficar calcificações residuais nodulares no pulmão, semelhante ao que ocorre na tuberculose. Alguns indivíduos podem apresentar a forma disseminada da infecção, incluem-se as pessoas com idades extremas (menores de 1 ano e maiores de 60 anos de idade) e pessoas com déficit de imunidade como pacientes em tratamento com corticóides,

leucêmicos, transplantados, pacientes que estão fazendo quimioterapia ou pacientes com SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)^{10, 13, 17, 21, 24}.

Existem fatores que influenciam na preservação e evolução da doença como a quantidade de esporos inalados e o estado imune do hospedeiro. A grande maioria das infecções são assintomáticas, por afetarem indivíduos imunocompetentes e com pouca exposição ao fungo¹⁰.

O objetivo dessa revisão bibliográfica é apresentar o fungo *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* como um patógeno de importância ascendente, principalmente após o advento da SIDA, bem como a epidemiologia dos casos ocorridos na região de Santo Ângelo – RS.

Para a análise da doença profunda, foi realizada uma revisão bibliográfica nas bases de dados do Lilacs, Medline, Pubmed e Scielo empregando-se as seguintes palavras chaves: Histoplasmose, Histoplasmina e *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*.

A pesquisa foi realizada de março a maio de 2005, sem restrição de idioma, sendo destacado os períodos de 1991 à 2005.

PATOGENIA

O contágio ocorre através da inalação de esporos do fungo. Uma vez o fungo instalado nos alvéolos pulmonares, é fagocitado por macrófagos. Com a temperatura corporal (37°C), passa para a forma de levedura, multiplicando-se dentro dos fagolisossomos e lisando o macrófago. As infecções por *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* são controladas por células T auxiliares que reconhecem os antígenos da parede celular fúngica e proteínas do choque

Recebido em 27/12/2005

Aprovado em 02/08/2006

*Revisão realizada como Trabalho de Conclusão do Curso de Farmácia Análises Clínicas da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Santo Ângelo/RS

¹Graduanda do Curso de Farmácia Bioquímica Clínica, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI.

²Professora Mestre das disciplinas de Parasitologia Clínica, Bacteriologia Clínica I e II e Micologia Clínica do Curso de Farmácia, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Das Missões – URI.

térmico e secretam interferon-gama que ativa os macrófagos para destruírem as leveduras intracelulares. O *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* induz os macrófagos a secretarem Fator de Necrose Tumoral-alfa (FNT- α), que estimula outros macrófagos a destruírem o fungo. Se a resposta do sistema imune é adequada, ocorre uma intensa reação granulomatosa seguida de cicatrização, fibrose e calcificação. Se não for controlada, a infecção pode alcançar os gânglios mediastínicos, corrente sanguínea e outros órgãos ricos em sistema monocítico – histiocitário como o fígado e baço^{5, 10, 9}.

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Diversas formas de classificação da histoplasmose têm sido utilizadas, entretanto, a forma mais recentemente proposta é: infecção assintomática, infecção pulmonar aguda, histoplasmose disseminada (aguda - tipo infantil, subaguda – tipo juvenil, crônica – tipo adulta e oportunistica) e histoplasmose pulmonar crônica^{8, 9, 13, 21}.

INFECÇÃO ASSINTOMÁTICA

Esta forma compreende aproximadamente 90-95 % dos casos de histoplasmose e nesses pacientes não é observada nenhuma sintomatologia clínica. O único dado observado está relacionado a uma conversão para positiva da reação intradérmica a histoplasmina e por reações sorológicas da infecção micótica. Pode-se ainda observar nesses pacientes evidências radiológicas, com presença de nódulos pulmonares calcificados, infiltrados pulmonares ou linfadenomegalias hiliares ou mediastínicas, nos quais se demonstra a presença de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*^{4, 20, 21}.

INFECÇÃO PULMONAR AGUDA

A doença aguda, que resulta na infecção primária, regride mais, freqüentemente, de modo espontâneo no decorrer de três a seis semanas, mas pode provocar complicações precoces e tardias^{13, 21, 26, 27}.

A infecção pulmonar aguda é manifestada por febre, calafrios, cefaléia, tosse improdutiva, dor torácica pleurítica ou subesternal, mal – estar e mialgia, podendo ser confundida com uma doença gripal. O período de incubação varia de 10 à 18 dias ou mais nos indivíduos que têm primoinfecção. Entretanto, nos casos de reinfecção, esse período é bem mais curto, variando de 3 à 7 dias. Os sintomas desaparecem habitualmente sem tratamento em duas semanas e em poucas vezes podem durar mais de seis semanas. Esta forma de histoplasmose raramente se revela mortal^{13, 21, 26, 27}.

Radiologicamente, essa forma caracteriza-se por pequenas áreas de pneumonite em meio a infiltrado intersticial difuso. Linfadenomegalia hilar é um achado freqüente, diferenciando a histoplasmose das pneumonias bacterianas e virais^{13, 21, 26, 27}.

HISTOPLASMOSE DISSEMINADA

A histoplasmose disseminada é definida pela presença de foco extrapulmonar e extraganglionar mediastínicos de curso progressivo. Representa a forma menos comum de histoplasmose (10% dos casos) desenvolve-se principalmente em indivíduos com imunidade deficiente, tais como lactentes com sistema imune imaturo; hospedeiros imunocomprometidos, como receptores de órgãos tratados com

corticóides e indivíduos infectados pelo HIV (Vírus da Imunodeficiência Adquirida). Esta forma pode ser dividida em quatro subtipos, que são: histoplasmose disseminada aguda (tipo infantil), histoplasmose disseminada subaguda (tipo juvenil), histoplasmose disseminada crônica (tipo adulto) e histoplasmose oportunistica^{1, 4, 9, 19, 20, 21, 25}.

Histoplasmose Disseminada Aguda (Tipo Infantil)

A histoplasmose disseminada aguda acomete freqüente crianças com menos de dois anos de idade. Tem início súbito e gradual, sendo geralmente precedida pela histoplasmose aguda. Febre, irritabilidade, fadiga progressiva, perda de peso e tosse são os sintomas iniciais. Em seguida surgem diarreia, vômitos e aumento do volume abdominal (hepatoesplenomegalia) e presença de linfadenomegalias superficiais. As manifestações hematológicas caracterizam-se por anemia, leucopenia e trombocitopenia. Em exames radiológicos podem ser evidenciadas lesões sugestivas de infecção primária ou quadro de pneumonia intersticial. Não diagnosticada e não tratada corretamente, essa forma evolui para o óbito em cerca de duas a cinco semanas^{1, 4, 9, 19, 20, 21, 25}.

Histoplasmose Disseminada Subaguda (Tipo Juvenil)

Esta forma manifesta-se por febre moderada e intermitente, mal-estar, astenia e emagrecimento progressivo. As lesões, em número variável e que surgem em seqüência indeterminada, conforme a localização, manifestam-se como doença ulcerativa intestinal, insuficiência supra-renal, meningoencefalite, síndrome de compressão medular ou lesões osteolíticas, lesões cutâneas ou subcutâneas, sendo pouco freqüentes ulcerações da orofaringe. Hepato e esplenomegalia são muito comuns^{1, 4, 9, 19, 20, 21, 25}.

Histoplasmose Disseminada Crônica (Tipo Adulto)

A histoplasmose disseminada crônica predomina em adultos acima de 40 anos e apresenta lesões de orofaringe ou laringe em cerca de 70% dos casos. Muitas vezes, nas áreas endêmicas, pode ser a única manifestação. Febre baixa e intermitente, astenia e emagrecimento acompanham a evolução muito lenta das lesões, que podem regredir espontaneamente e reaparecer no mesmo sítio orgânico ou em outro sítio. Esses episódios podem ocorrer durante 10 anos ou mais^{1, 4, 9, 19, 20, 21, 25}.

HISTOPLASMOSE OPORTUNÍSTICA

Nas áreas endêmicas de histoplasmose são muitos os casos da micose oportunistica associada à doença de Hodgkin, linfossarcoma, leucemia, lúpus eritematoso sistêmico, AIDS, transplantados, usuários de corticóides e pacientes em quimioterapia. Nessas situações, a micose pode originar-se de um reinfecção endógena ou exógena. A febre está sempre presente, tosse pouco produtiva ou não-produtiva, dispnéia, infiltrado intersticial difuso, linfadenomegalias hiliares e hepatoesplenomegalia. A maior dificuldade neste processo é a diferenciação entre as manifestações da doença de base e da micose e, às vezes, seu tratamento pode ser agressivo para o paciente. Quando não diagnosticada corretamente evolui para o óbito^{7, 20, 21}.

HISTOPLASMOSE PULMONAR CRÔNICA

A histoplasmose pulmonar crônica está relacionada à presença de enfisema centrolobular ou bolhoso ou defeito anatômico estrutural que favorece à instalação do foco inicial da doença. Com freqüência, assemelha-se a tuberculose quanto à sintomatologia e manifestações radiográficas, embora a evolução desse tipo de histoplasmose seja mais

leve e indolente que a tuberculose. A colonização dos espaços aéreos determina a produção local de material líquido rico em elementos fúngicos que, por disseminação, causam focos de pneumonite segmentar, ocasionando fibrose pulmonar progressiva. Incide geralmente em homens, a partir da terceira década de vida, residentes em áreas endêmicas^{13, 21, 26, 27}.

EPIDEMIOLOGIA

Na primeira metade do nosso século, casos de histoplasmose foram relatados de modo esporádico, principalmente nos Estados Unidos, isto é, nas regiões dos Grandes Lagos e no vale do Mississipi. Nessas áreas endêmicas, mais de 80% dos indivíduos são infectados aos 20 anos de idade. Entretanto, essa incidência, inicialmente tão circunscrita, começou a ganhar outros continentes no final da década de 1960^{9, 15, 24, 20, 21}.

Atualmente a histoplasmose possui distribuição mundial, tendo sido descrita em mais de 50 países, com maior prevalência nas zonas tropicais e temperadas^{9, 20, 21, 24}.

A delimitação das áreas endêmicas é verificada através da reação intradérmica com histoplasmina e do estudo em animais. Há relatos de microepidemias em grupos de indivíduos que visitaram grutas habitadas por morcegos ou tiveram contato com galinheiros, pombais ou casas desabitadas^{9, 20, 21, 24, 29}.

No Brasil, a infecção é descrita em casos esporádicos, tendo relatos de surtos no Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e Minas Gerais. Outros países, com regiões endêmicas, na América do Sul são Argentina, Venezuela, Colômbia e Peru^{9, 20, 21, 24}.

No Rio Grande do Sul, um estudo feito por Zembrzuski e colaboradores no ano de 1992, que foi realizado com 161 soldados, na faixa etária dos 17 aos 19 anos, onde contataram a prevalência de histoplasmose através da reação cutânea positiva para histoplasmina. A partir disto, concluiu-se que 48% da população estudada apresentava positividade para esta reação, caracterizando este local como foco ambiental do fungo.

No caso de uma infecção pulmonar, esta não confere imunidade protetora; por conseguinte, pode ocorrer reinfeção. Apesar de a idade, o sexo e a raça não afetarem, significativamente, a suscetibilidade à infecção, os homens brancos de meia idade com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) pré-existente parecem correr o maior risco de desenvolver a forma pulmonar crônica. Nos últimos anos o *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* surgiu como patógeno oportunista, sobretudo em hospedeiros com imunidade celular alterada, principalmente em pacientes com SIDA^{9, 20, 21, 24}.

A partir de 1987 todos os casos de indivíduos infectados pelo HIV com histoplasmose extrapulmonar foram definidos como tendo SIDA, pelo Centers for Disease Control (CDC)¹. Em áreas endêmicas da micose, esta doença pode representar a primeira manifestação da SIDA. Nesta síndrome, como em outras doenças imunodepressoras, a histoplasmose representa, muito provavelmente, uma reativação de focos latentes de infecção pregressa ou, mais raramente, aquisição exógena, por ocasião da imunodepressão¹.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Para um diagnóstico correto, cabe destacar a importância da anamnese, que deve basear-se no estado de saúde do paciente e se este apresenta histórico de permanência em país endêmico. Também é necessário a obtenção de uma amostra adequada, principalmente respiratórias, e a

punção ou aspiração de medula óssea. A abordagem diagnóstica varia, em parte, com a síndrome clínica em consideração. Contudo, o diagnóstico definitivo de histoplasmose deve ser confirmado através de exames laboratoriais pelo encontro do agente em esfregaços de espécimes clínicos ou em cortes histológicos de tecidos biopsiados e pelo isolamento em cultivo e identificação do fungo^{9, 18, 20, 21}. Para o diagnóstico da histoplasmose diversos materiais biológicos podem ser utilizados, como: escarro, urina, raspados ou exudatos da lesão, aspirado de medula óssea ou leucócitos para cultura; biópsias de medula óssea, da pele ou de linfonodos para estudo histológico; e sangue para provas sorológicas^{2, 3, 4}.

DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO

O diagnóstico micológico da histoplasmose é baseado no encontro do seu agente casual, *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, em materiais biológicos. Para isso, empregam-se, concomitantemente, duas metodologias: exame direto e cultura^{20, 21}.

Exame Microscópico Direto

O exame do material a fresco tratados com hidróxido de potássio (KOH) a 10% tem pouco valor porque se trata de parasito com pequenas dimensões, aproximadamente 3 micras de diâmetro, difícil de ser diferenciado^{4, 20, 21}.

Nos esfregaços corados por Giemsa, o *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* é visualizado como elementos arredondados ou ovalados, dentro de macrófagos. O citoplasma se cora de azul claro, e o núcleo localizado em um dos pólos, se cora mais intensamente. Observa-se um halo claro ao redor do fungo. Essas formas são difíceis de ser visualizadas no exame direto do escarro. O melhor rendimento é obtido com esfregaços submetidos à impregnação pela prata, embora persistam as dificuldades de interpretação^{21, 22, 23, 24}.

Cultura

As amostras devem ser cultivadas a 37°C, podendo ser utilizados os ágaros: Sabouraud dextrose sólido; Mycobiotic® ou o Mycosel® (ambos contendo cloranfenicol e cicloheximida); o meio BHI (ágar infusão cérebro – coração) adicionado de cloranfenicol e de cicloheximida na proporção de 0,05g e 0,5 g/mL, respectivamente, ou BHI - ágar sangue^{4, 20, 21}.

O fungo é dimórfico, isto é, apresenta forma micial na temperatura de 25°C e forma leveduriforme, quando cultivado em meios ricos a 37°C¹¹.

A 22-28°C crescem cultivos brancos, algodonosos de desenvolvimento lento, com micélio aéreo que tendem a escurecer com o tempo. Microscopicamente, observam-se hifas delgadas, septadas, microconídios lisos ou clamidoconídios lisos e esquinulados, além de uma grande quantidade de macroconídios tuberculados (ou mamilonados) conhecidos como estalagmosporos. Em meios ricos como o BHI, acrescidos ou não de sangue incubados a 37°C, o *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* cresce na forma de levedura, formando colônias cremosas, úmidas, brilhantes e lisas^{11, 20, 21, 24}.

DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO

A histoplasmose é uma doença granulomatosa e seu diagnóstico histopatológico pode ser feito quando macrófagos parasitados com células leveduriformes são visualizados em cortes histológicos corados pela hematoxilina-eosina. Cada levedura aparecerá como um corpúsculo levemente basofílico, esférico ou ovalado, rodeado por um halo claro delimitado por uma parede celular muito fina e hialina²¹.

Nas lesões pulmonares crônicas, a reação é a de granuloma com ou sem células gigantes de Langhans, tendo a parte central necrosada, calcificada e as margens fibrosadas⁴.

DIAGNÓSTICO IMUNOLÓGICO

Devido a resposta imunológica tanto celular como humoral em pacientes imunocompetentes, pode-se realizar provas sorológicas e cutâneas. Nas primeiras, detectam-se anticorpos e antígenos do fungo que permitem monitorar a evolução e a resposta ao tratamento, as outras servem para evidenciar a reação de hipersensibilidade tipo IV¹⁸.

As provas sorológicas são muito úteis para o diagnóstico de histoplasmose, tanto que resultam positivas em 80% das formas disseminadas, 90% das formas pulmonares agudas e 100% das formas pulmonares crônicas¹⁰.

Reações Sorológicas

Para as reações sorológicas, podem ser utilizadas várias técnicas como a Reação de Fixação do Complemento (RFC), Imunodifusão Dupla (ID) e Radioimunoensaio (RIA)^{4,21}.

Para fixação do complemento, pesquisa-se anticorpos contra o antígeno extraído da fase leveduriforme do *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, porque se mostra mais sensível. Os resultados da RFC interpretam-se como em outras infecções micóticas, isto é, quanto mais grave o paciente, tanto mais alto o título da reação e vice-versa. Um pouco antes da morte, o título pode cair à zero^{4,21}.

A Imunodifusão Dupla baseia-se na pesquisa de anticorpos que são produzidos após reagirem com precipitinas específicas (H e M). É técnica mais utilizada para auxiliar no diagnóstico das micoses sistêmicas^{4,21}.

O teste de ID tem sido mundialmente aceito como o principal método para detecção de anticorpos na histoplasmose, porque além de ser prova de fácil e rápida execução, é mais específica que outras provas sorológicas²¹.

O RIA é o teste mais sensível para detecção de antígenos circulante de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. Quase todos os pacientes com histoplasmose disseminada apresentam teste positivo para o antígeno no soro ou na urina. Os níveis de antígeno caem após tratamento bem sucedido, porém reaparecem durante a recidiva. Apesar da ocorrência de reações cruzadas com outras micoses, este teste para antígeno é mais sensível do que os testes de anticorpos convencionais em pacientes com SIDA acometidos de histoplasmose^{2,3}.

Reações Cutâneas

O teste mais utilizado de reação cutâneas é o intradérmico pela histoplasmina. O antígeno histoplasmina é um filtrado de culturas de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. Uma reação positiva tem valor diagnóstico quando, antes da manifestação sintomática da infecção, for constatada reação negativa. Também tem valor diagnóstico a reação positiva em crianças menores de 2 anos de idade. A reação negativa pode significar ausência de infecção, infecção muito recente ou fase terminal da doença^{2,3,4,21}.

O teste cutâneo com histoplasmina resulta numa técnica sensível, rápida e confiável, com resultado positivo em 50% dos pacientes. Não resulta de tanta utilidade em áreas endêmicas onde é positivo em 80% das pessoas maiores de 16 anos. A resposta celular manifesta-se habitualmente de 15-40 dias após o contato ou de 30-50 dias após o início dos sintomas, mantendo-se positiva durante anos. Pode apresentar falso-positivos por reações cruzadas com outros fungos (*Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis* e *Paracoccidioides brasiliensis*) e falso-negativos em pacientes imunossuprimidos¹⁰.

O teste cutâneo com histoplasmina, apesar de importante nos estudos epidemiológicos, não é recomendado para fins de diagnóstico, devido a uma elevada taxa de positividade entre pessoas que residem em áreas endêmicas. Além disso, o teste cutâneo pode produzir uma falsa elevação nos títulos de anticorpos séricos^{9,18,20,21}.

Baseando-se nas diferentes provas diagnósticas, em caso de doença autolimitada, devem-se fazer provas sorológicas. Para a forma pulmonar crônica e disseminada recomenda-se fazer o cultivo, biópsia e sorologia. Nas formas disseminadas a forma mais rápida e útil é a determinação do antígeno²⁸.

TRATAMENTO

A histoplasmose geralmente é uma infecção benigna e autolimitada. Os casos de regressão espontânea não necessitam de tratamento específico, sendo repouso e observação clínica as medidas mais eficazes. O cetoconazol constitui o tratamento utilizado para infecção leve ou moderada. Na doença disseminada, o tratamento sistêmico com anfotericina B é quase sempre curativo, embora alguns pacientes possam necessitar de tratamento prolongado e de monitorização, devido à ocorrência de recidivas. Tipicamente, os pacientes com SIDA sofrem recidiva apesar da terapia, que seria curativa em outros indivíduos. Por conseqüência os pacientes com SIDA necessitam de terapia de manutenção com cetoconazol por via oral ou com anfotericina B semanalmente^{2,3,4,11,16,17,20,21,22,24}.

REFERÊNCIAS

1. BORGES, A. S.; FERREIRA, M. S.; SILVESTRE, M. T.; NISHIOKA, S. de A.; ROCHA, A. Histoplasmose em Pacientes Imunodeprimidos: Estudo de 18 Casos Observado em Uberlândia, MG. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 30, p. 119-124, 1997.
2. BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. *Microbiologia Médica*. 21ª Edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro: 2000.
3. BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; ORNSTON, N. *Microbiologia Médica*. 20ª Edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro: 1998.
4. CARVALHÃES, J. *Micologia Médica. Control - Lab*. Rio de Janeiro: 1999.
5. CONTRAN, R., S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. *Robbins Patologia Estrutural e Funcional*. 6ª Edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro: 2000.
6. CURY, G. C.; FILHO, A. D.; CRUZ, A. G. da C. e; HOBAIKA, A. B. de S. Surto de Histoplasmose em Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 34, p. 483-486, 2001.
7. D'AVILA, S. C. G. P.; CHAPADEIRO, E. Características Histopatológicas e Imunohistoquímicas das Lesões Cutâneas e da Mucosa Oral na Histoplasmose Disseminada de Portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 31, p. 539-547, 1998.
8. EISSENBERG, L. G.; GOLDMAN, W. E. *Histoplasma Variation and Adaptive Strategies for Parasitism: New Perspectives on Histoplasmosis*. *Clinical Microbiology Reviews*, 1991.
9. GOLDMAN, L.; BENNETT, J. C. Cecil, *Tratado de Medicina Interna*. v. II, 21ª Edição. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro: 2001.
10. FLOR, A.; ESTIVILL, D.; PÉREZ, R.; ORDEIG, J.; RAMOS, F.; BEL, J. S.; PUIG, X. Histoplasmosis Pulmonar Aguda En Un Viajero Español a Nicaragua: Ejemplo de Enfermedad Importada. *Revista Iberoamericana de Micología*. v. 20, p. 24-28, 2003.
11. HENRY, J. B. *Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais*. 19ª Edição. Editora Manole, São Paulo: 1999.
12. KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. Jr. *Diagnóstico Microbiológico - Texto e Atlas Colorido*. 5ª Edição. Editora Médica, Rio de Janeiro: 2001.
13. LACAZ, C. da S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; VACCARI, E. M. H.; MELO,

- N. T. Tratado de Micologia Médica. Editora Sarvier. São Paulo: 2002.
14. LOPÉZ, M.; MEDEIROS, J. L. Semiologia Médica As Bases do Diagnóstico. V. II. 4ª Edição. Editora Revinter, Rio de Janeiro: 1999.
15. MONTES, M. Del R. R.; TAYLOR, M. L.; QUESADA, E. C.; ARANGO, A. C. M. Estado Actual de la Tipificación Del Hongo Patógeno *H. capsulatum* var. *capsulatum*: Uma Revisión de los Hallazgos. Revista Iberoamericana de Micología. v. 17, 2000.
16. NEGRONI, R. Clinical Spectrum and Treatment of Classic Histoplasmosis. Revista Iberoamericana de Micología: 2000.
17. NEGRONI, R.; HELOU, S. H.; DANERI, G. L.; ROBLES, A. M.; ARECHAVALLA, A. I.; BIANCHI, M. H. Interrupción de la Profilaxis Secundaria Antifúngica em la Histoplasmosis Asociada al Sida. Revista Iberoamericana de Micología. v. 21, p. 75-78, 2004.
18. RODRIGUES, J. M. T.; FORCADELL, E. R.; GASCÓN, J.; JODRA, O. L.; ESPASA, M. Utilidad Diagnóstica de la Prueba Intradérmica com Histoplasmina no Endêmicas de Histoplasmosis. Revista Iberoamericana de Micología. v. 17, p. 97-101, 2000.
19. SEVERO, L. C.; ZARDO, I. B.; ROESCH, E. W.; HARTMANN, A. A.. Acute Disseminated Histoplasmosis in Infancy in Brazil: Reporto a Case and Review. Revista Iberoamericana de Micología. v. 15, p. 18-50, 1998.
20. SIDRIN, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. Fundamentos Clínicos e Laboratoriais de Micologia Médica. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro: 1999.
21. SIDRIN, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Micologia Médica a Luz de Autores Contemporâneos. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro: 2004.
22. TIERNEY, L. M. Jr.; MCPHEE, S. J.; PAPADAKIS, M. A. Lange Diagnóstico e Tratamento 2004. 41ª Edição. Editora Atheneu, São Paulo: 2004.
23. TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 6ª Edição. Artmed Editora. Porto Alegre: 2000.
24. TRABULSI, L. R. Microbiologia. 2ª Edição. Editora Atheneu. São Paulo: 1998.
25. UNIS, G.; OLIVEIRA, F. de M.; SEVERO, L. C. Histoplasmosse Disseminada no Rio Grande do Sul. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v. 37, p. 463-468, 2004.
26. UNIS, G.; PEGAS, K. L.; SEVERO, L. C. Histoplasmona Pulmonar no Rio Grande do Sul. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v. 38, p. 11-14, 2005.
27. UNIS, G.; ROESCH, E. W.; SEVERO, L. C. Histoplasmosse Pulmonar no Rio Grande do Sul. Jornal Brasileiro de Pneumologia. v. 31, p. 52-59, 2005.
28. WHEAT, J. Dimorphic Fungi in Biology and Medicine. Plenum Press. P. 333-340, New York: 1993.
29. ZEMBRZUSKI, MM; BASSANESI, MC; WAGNER, LC; SEVERO, LC. An Intradermal Test With Histoplasmin and Paracoccidioidin in 2 Regions of Rio Grande do Sul. Revista da Sociedade de Medicina Tropical. v. 1, p. 1-3, 1996.

Endereço para correspondência:

Profª Letícia Silveira Goulart

Av. Universidade das Missões, 464/13203

CEP 98802-470 Santo Ângelo, RS, Brasil.

E-mail: lgoulart@urisan.tche.br



Sociedade Brasileira de Análises Clínicas®

**IFCC WORLDLAB
Fortaleza - Brasil**

**20º Congresso Internacional de Bioquímica e Medicina Laboratorial
35º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas
8º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica**

28 de setembro - 2 outubro/2008

Local:
Centro de Convenções do Ceará

Valores de hemácias, plaquetas, leucócitos totais e das subpopulações dos linfócitos em recém-nascidos com sepse e sadios*

Values of red blood cells, platelets, total leukocytes and lymphocyte subpopulations in septic and healthy newborns

Alaide da Silva Pitombeira¹; José Ajax Nogueira Queiroz² & Talapala G. Naidu²

RESUMO - Diferentes parâmetros celulares hematológicos e os valores da proteína C-reativa (PCR) sanguíneo foram avaliados em 21 recém-nascidos (RN) sépticos e dez sadios, objetivando identificar aqueles que se correlacionem com a ocorrência e evolução da doença. Não foram constatadas diferenças significantes, entre sépticos e sadios, nos valores médios de hemácias, hematócrito, hemoglobina, plaquetas e linfócitos totais. A contagem de leucócitos totais se mostrou elevada em sépticos ($18.080 \pm 9.210/\mu\text{L}$, contra $12.040 \pm 3.980/\mu\text{L}^3$ nos controles; $p=0,017$), devido, principalmente, ao aumento nos neutrófilos circulantes. Nas avaliações imunofenotípicas das subpopulações linfocitárias (NK, TCD4+, TCD8+, células B), somente linfócito NK apresentou diminuição significativa nos sépticos ($80 \pm 80/\mu\text{L}$, contra $250 \pm 220/\mu\text{L}^3$ para controles; $p=0,004$). Porém, sépticos que responderam ao tratamento revelaram valores significativamente menores de NK do que os que foram ao óbito ($32 \pm 20/\mu\text{L}$ e $120 \pm 89/\mu\text{L}^3$, respectivamente; $p=0,012$); com ambos os valores situando-se abaixo do valor-controle. PCR estava significativamente elevada nos sépticos que foram ao óbito, em comparação daqueles que responderam ao tratamento ($38,0 \pm 30,7$ mg/L e $13,0 \pm 8,8$ mg/L, respectivamente; $p=0,041$), revelando-se positivamente correlacionada com a gravidade da doença. Esses dados parecem sugerir que a incidência e a evolução da sepse neonatal não se relacionam com alterações significativas inerentes nos parâmetros quantitativos das hemácias, ou dos linfócitos T e B circulantes. As significantes elevações evidenciadas nos neutrófilos e nos leucócitos totais circulantes dos pacientes sépticos, parecem ser conseqüências da gravidade da infecção bacteriana, e não a causa da sepse neonatal. Embora o número médio das células NK circulantes tenha se mostrado diminuído nos pacientes, o valor médio de NK dos sépticos que foram a óbito foi significativamente maior do que dos RNs que responderam ao tratamento. Estes dados dificultam a avaliação do real significado das células NK no processo séptico neonatal.

PALAVRAS-CHAVE - Sepse neonatal, parâmetros hematológicos, subpopulações linfocitárias, PCR.

SUMMARY - Blood cellular parameters and C-reactive protein (CRP) values were evaluated in 21 septic and 10 healthy newborns, in order to identify those that might correlate with the onset and progression of sepsis. There were no significant differences, between septic and healthy newborns, in the mean values of red cells, hematocrit and hemoglobin scores, platelets and total lymphocytes. Total leukocyte counts were significantly elevated in septic newborns ($18080 \pm 9210/\mu\text{L}$, against $12040 \pm 3980/\mu\text{L}^3$ in controls; $p=0.017$), due to increased neutrophil counts. Immunophenotypy evaluations of lymphocyte subpopulations (NK, TCD4+, TCD8+, B cells), showed that only NK cells were significantly reduced in septic newborns ($80 \pm 80/\mu\text{L}$ against $250 \pm 220/\mu\text{L}^3$ for controls; $p=0.004$). However, septic children who responded to treatment had significantly lower NK values than those who succumbed to disease ($32 \pm 20/\mu\text{L}$ and $120 \pm 89/\mu\text{L}^3$, respectively. $p=0.012$), but both these values were below that of the controls. CRP was significantly raised in fatal sepsis, than in septic newborns who responded to treatment ($38.0 \pm 30.7\text{mg/L}$ and 13.0 ± 8.8 mg/L, respectively; $p=0.041$), revealing to be positively correlated with disease progression. These results seem to suggest that the incidence and evolution of neonatal sepsis are not related to significant inherent alterations in the quantitative parameters of circulating red cells, or the T and B lymphocytes. The significant alterations observed in neutrophils and total leukocytes of septic patients appear to be the consequences of the severity of the bacterial infection, and not the cause of neonatal sepsis. Even though the mean circulating NK cell number was reduced in the septic patients compared to that of the controls, the mean NK value in the fatally septic neonates was significantly higher than that observed in the neonates who responded favorably to antibiotic therapy. These observations render difficult the evaluation of the real significance of NK cells in the neonatal septic process.

KEYWORDS - Newborn sepsis, hematological parameters, lymphocyte subpopulations, CRP.

INTRODUÇÃO

A infecção neonatal é uma das principais causas de morbi-mortalidade do recém nascido (RN)¹. Segundo Paravicini *et al.*², a incidência da sepse neonatal varia de 30% dos neonatos de peso muito baixo ao nascer a 0,4% em RN pré-termo (RNPT) e 0,1% em RN a termo, ocorrendo maior morbidade e mortalidade, especialmente nos pré-termos. Alguns estudos sugerem que a desregulação na expressão e produção de citocinas hematopoéticas no neonato contribui para as deficiências qualitativas e quantitativas da atividade das células progenitoras mielóides e, conseqüentemente, dos polimorfonuclearneutrófilos (PMN) efetores ma-

duros, o que eleva a susceptibilidade do neonato à sepse^{2,3}. A proteção do RN contra as infecções inicia-se na vida intra-uterina. O líquido amniótico representa uma barreira eficiente à infecção, em virtude da presença de vários fatores de defesa⁴. O elemento central da resposta imune inata à infecção bacteriana é o fagócito PMN, cuja atuação mostra-se deficiente no neonato⁵. A reserva medular de PMN é considerada pequena, em relação ao peso, nos RN a termo e nos RN pré-termo, em comparação com a do adulto^{6,7}, o que caracteriza os RN sem capacidade para aumentar a concentração dessa célula durante a infecção³. A célula natural killer (NK), um dos componentes da imunidade inata que representa cerca de 15% dos linfócitos

Recebido em 06/01/2005
Aprovado em 27/07/2006

*Trabalho realizado no Setor de Imunologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará (UFC), e no Laboratório Clementino Fraga, Fortaleza, Ceará.

¹Hospital Infantil Albert Sabin, Fortaleza, Ceará

²Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina - UFC

circulantes, participa nas defesas às infecções intracelulares e células neoplásicas, e migra do sangue aos tecidos infectados em resposta às citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF- α)⁸. Godula-Stuglik *et al.*⁹ encontraram baixos valores de NK nos RN sépticos.

O sistema inato apresenta um importante papel no controle da imunidade adaptativa através da regulação de moléculas co-estimuladoras e citocinas efectoras¹⁰. Em comparação ao adulto, as funções das células T são diminuídas no feto e no RN, incluindo a citotoxicidade mediada pelo T CD8+ (Tc) nas infecções virais, a hipersensibilidade tardia e a regulação da anticorpo-gênese pelo linfócito B (LB)¹¹. Embora o feto possa gerar a IgM a partir da oitava semana, a falta de estímulos antigênicos e a relativa deficiência na atuação dos linfócitos T helper (LT CD4+) contribuem para a pouca presença de anticorpos nos RN¹².

O diagnóstico precoce da sepse em recém-nascidos é difícil em virtude dos primeiros sinais clínicos serem mínimos e inespecíficos. Por não haver um indicador laboratorial precoce e definitivo, a observação clínica é, muitas vezes, o único recurso disponível^{13,14}. O diagnóstico de certeza da sepse neonatal requer a hemocultura positiva¹⁵; entretanto, as culturas de líquidos biológicos e de secreções do organismo apresentam uma baixa incidência de resultados positivos^{16,17}. Apesar da baixa sensibilidade, a hemocultura positiva ainda é considerada o teste mais fidedigno para o diagnóstico definitivo da sepse. Alguns consideram a neutropenia como o sinal preditivo positivo mais exato de infecção do neonato, com os RN sépticos neutropênicos tendo mais alta mortalidade do que os não neutropênicos^{18,3}. Para Ghosh & Mitta^{12,3}, e Jaganathan¹⁹, os índices neutropênicos anormais [a relação PMN imaturo/total dos PMN (I/T), e a relação PMN imaturos/PMN maduros (I/M)] foram os indicadores mais sensíveis para identificação de crianças com sepse. A trombocitopenia é um problema hematológico comum encontrado no período neonatal, particularmente nos RN doentes, prematuros e neonatos admitidos em unidades de tratamento intensivo²⁰. Na sepse as plaquetas são capazes de modular não somente suas próprias funções mas também das células que as rodeiam, e não sofrem ação das citocinas TNF- α , IL-1, IL-6 produzidas nessas condições²¹. A proteína C-reativa (PCR) tem sido estudada como um marcador de screening da doença ativa e como um auxiliar em diagnóstico²². Elevação nos níveis circulantes de PCR na sepse neonatal fora observada por alguns autores^{23,24}. Para Hengst²⁵, a avaliação quantitativa de PCR, obtida 24 h após o início de sinais e sintomas de infecção com medidas seriadas a cada 12 ou 24h, é a mais sensível e confiável das informações sobre a existência da sepse.

O presente trabalho objetivou determinar os valores hematológicos de série vermelha, plaquetas, leucócitos totais, linfócitos totais e suas subpopulações, e da PCR dos recém-nascidos sépticos e sadios, procurando identificar aqueles parâmetros que se correlacionem com a ocorrência e evolução da sepse.

MATERIAL E MÉTODOS

Vinte e um RN sépticos, diagnosticados e internados no Centro de Tratamento Intensivo Neonatal (CTI) do Hospital Infantil Albert Sabin (HIAS), e dez recém-nascidos saudáveis do Centro Obstétrico do Hospital Geral e Maternidade Angeline (HGMA) (controles), de idades de até 20 di-

as e de ambos os sexos, foram objeto do estudo. O diagnóstico de sepse foi estabelecido conforme os critérios de Tollner²⁶; Küster *et al.*²⁷, e Martius²⁸, modificados pelo HIAS. Os seguintes parâmetros laboratoriais foram empregados como indicadores da infecção: PCR \geq 6mg/L, neutropenia (neutrófilos circulantes $<$ 1.500/ μ L) e o índice neutrofílico (a relação de neutrófilos imaturos para neutrófilos totais) \geq 0,2 nas primeiras 72 horas do nascimento¹⁸. Os RN sépticos internados foram monitorados de acordo com o protocolo do Hospital e os dados clínicos e laboratoriais foram obtidos diariamente no período de 1 a 3 semanas após a admissão no CTI. O grupo controle foi constituído de dez recém-nascidos, cinco de cada sexo, de mães com gravidez e parto sem complicações, de idade gestacional entre 37-42 semanas e com Apgar no 5º minuto de vida \geq 7; excluindo-se os seguintes: RN de mães com fatores obstétricos de risco e uso de antibiótico no período pré e intra-parto, malformações congênitas, enfermidades maternas (hipertensão arterial, diabetes mellitus) e parto gemelar.

Após consentimento informado das mães, foi coletado sangue por punção venosa periférica de crianças sépticas, e do cordão umbilical de controles. Realizou-se a coleta de sangue sem a EDTA para a avaliação laboratorial do PCR, e com a EDTA para proceder a realização dos demais exames laboratoriais. O hemograma foi realizado em contador automático (Cell Dyn 1700 - ABBOTT) e a contagem diferencial de leucócitos manualmente, em lâminas coradas pelo May-Grunwald-Giemsa e incluiu a morfologia dos granulócitos e a presença de sinais de degeneração leucocitária (vacuolização citoplasmática e, granulações tóxicas). As amostras para a realização da imunofenotipagem foram mantidas a temperatura ambiente, processadas e analisadas dentro de 12 horas. A imunofenotipagem foi realizada no sangue por citometria de fluxo (Fluorescence-Activated Cell Sorter - FACS), utilizando-se anticorpos monoclonais (Cyto-Stat/Coulter Clone) para a identificação das seguintes subpopulações de linfócitos: linfócitos B (CD19+), linfócitos T (CD3+), linfócitos T helper (CD3+/CD4+), linfócitos T citotóxicos (CD3+/CD8+) e células natural killer - NK (CD56+). Os dados obtidos foram processados pelo programa Epi-Info, versão 6,0 para obtenção da média, mediana e desvio padrão.

A determinação da PCR foi realizada em amostras de soro dos RNs sépticos, usando-se o Kit imuno-latex PCR. A presença de aglutinação tênue ou nítida indica resultado positivo e concentração \geq 6mg/L. A ausência de aglutinação implica em resultado negativo e concentração $<$ 6mg/L.

Os resultados foram avaliados pelo teste t de Student e pelo teste do qui-quadrado, a nível de significância de 0,05. Este projeto de pesquisa foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana do Hospital Albert Sabin, em conformidade com as Normas da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEPE), do Conselho Nacional de Saúde.

RESULTADOS

Os valores médios da série vermelha e das plaquetas nos grupos casos e controles não revelaram diferenças estatisticamente significantes (Tabela 1). O estudo da série branca dos RN sépticos e controles mostrou diferença significativa tanto entre os valores médios de leucócitos totais (18.080 \pm 9.210/ μ L e 12.040 \pm 3.098/ μ L, respectivamente; p=0.016), como também nos neutrófilos totais

(10.620±6.449/ μ L, contra 6.275±2.299/ μ L para controles; p=0.017). Porém, o índice neutrofílico e as contagens absolutas de linfócitos totais não revelaram diferenças significativas nos valores médios dos grupos casos e controles (Tabela 1). Os valores médios das subpopulações linfocitárias (LT CD3+/CD4+; LT CD3+/CD8+; LB CD20+ e NK CD56+) dos recém-nascidos sépticos e não-séptico não demonstraram diferenças significativas nos subgrupos TCD4+ e TCD8+, bem como nas células B; porém a diferença nos valores do TCD4+ situava-se no limiar da significância (Tabela 2). Entre os recém-nascidos sépticos, os que foram ao óbito (subgrupo-óbito) e os que responderam favoravelmente ao tratamento (subgrupo-alta), não revelaram diferenças significativas nos valores médios das hemácias, plaquetas, leucócitos totais, neutrófilos totais, índice neutrofílico e linfócitos totais (Tabela 3). Avaliações imunofenotípicas também não constatarem diferenças significativas entre os subgrupos óbito e alta nos valores das subfamílias de LT, como também nos valores do LB (Tabela 2). O valor médio da PCR sérica se mostrou significativamente mais elevado no subgrupo-óbito, em comparação do valor do subgrupo-alta (38,0 ± 30,7 mg/L e 13,0 ± 8,8 mg/L, respectivamente. p = 0,041) (Tabela 3). O valor médio das células NK foi significativamente menor nas crianças sépticas, do que nos controles (80±80/ μ L e 250±220/ μ L, respectivamente. p=0,0041) (Tabela 2). Porém, o subgrupo séptico que foi ao óbito revelou um valor médio de NK significativamente maior do que do subgrupo-alta que respondeu ao tratamento (120±89/ μ L contra 32±20/ μ L; p = 0,0124) (Tabela 3).

TABELA I
Distribuição dos valores de série vermelha, plaquetas, leucócitos totais e neutrófilos em Recém-nascidos Sépticos e Controles.

PARÂMETROS	SÉPTICOS (n=21)	CONTROLES (n=10)	p
	Média ± DP e variação	Média ± DP e variação	
Hemácias [$\times 10^6/\mu$ L]	4,35 ± 0,82 (2,90 – 6,00)	4,39 ± 0,55 (3,60 – 5,20)	0,89 47
Hemo globina [g/dL]	13,93 ± 3,06 (9,50 – 20,10)	13,89 ± 1,96 (11,30 – 17,40)	0,96 78
Hematócrito [%]	42,64 ± 9,16 (23,5 – 63,1)	45,13 ± 5,60 (37,2 – 52,5)	0,43 74
Plaquetas [$\times 10^3/\mu$ L]	242,80 ± 157,03 (23,0 – 599,0)	220,40 ± 91,69 (55,0 – 355,0)	0,81 62
Leucócitos totais [μ L]	18.080 ± 9.210 (5.600 – 35.100)	12.040 ± 3.980 (4.200 – 17.400)	0,016*
Neutrófilos totais [μ L]	10.620 ± 6.449 (2.230 – 23.680)	6.275 ± 2.299 (1.848 – 9.017)	0,017*
Neutrófilos Imaturos [μ L]	883 ± 643 (60 – 2.910)	320 ± 338 (0,0 – 1.160)	0,135
Neutrófilos Segmentados [/ μ L]	9.737 ± 5.937 (2.160 – 22.650)	5.955 ± 2.133 (1.554 – 8.509)	0,159
Índice neutrofílico	0,05 ± 0,03 (0,01 – 0,12)	0,05 ± 0,05 (0,0 – 0,16)	0,983

Teste qui-quadrado (X2): p ≤ 0,05

* Diferença significativa

TABELA II
Valores dos linfócitos totais e suas subpopulações dos Recém-nascidos Sépticos e Controles

PARÂMETROS	Sépticos (n=21)	Controles (n=10)	p
	Média ± DP (variação)	Média ± DP (variação)	
Linfócitos totais [/ μ L]	6.230 ± 5.020 (900 – 19.070)	5.000 ± 2.500 (2.100 – 10.960)	0,9663
Linfócitos T [CD3*] [/ μ L]	4.870 ± 3.780 (530 – 14.970)	3.560 ± 1.860 (1.480 – 7.810)	0,5262
Linfócitos B [CD19*] [/ μ L]	1.000 ± 1.630 (10 – 7.400)	700 ± 580 (120 – 1.590)	0,9663
Linfócitos Helper [CD4] [/ μ L]	3.470 ± 2.760 (340 – 10.610)	1.670 ± 1.640 (780 – 4.910)	0,0518
Linfócitos Citotóxicos [CD8*] [/ μ L]	1.310 ± 1.070 (190 – 4.290)	830 ± 1.060 (315 – 3.510)	0,0830
[CD4+ / CD8*]	2,88 ± 1,33 (1,0 – 5,4)	2,42 ± 0,88 (1,2 – 3,8)	0,4008
Natural Killer [CD56*] [/ μ L]	80 ± 80 (10 – 290)	250 ± 220 (50 – 690)	0,0041*

Teste qui-quadrado (X2): p ≤ 0,05

* Diferença significativa

TABELA III
Valores dos parâmetros hematológicos em Recém-nascidos Sépticos que responderam ao tratamento e dos que foram a óbito

PARÂMETRO	Sépticos com alta (n=10)	Sépticos com óbito (n=11)	p
	Média ± DP (variação)	Média ± DP (variação)	
Hemácias [$\times 10^6/\mu$ L]	4,41 ± 0,91 (2,9 – 5,8)	4,27 ± 0,75 (3,5 – 6,0)	0,7016
Hematócrito [%]	43,05 ± 9,11 (28,5 – 55,9)	42,19 ± 9,68 (29,1 – 63,1)	0,8353
Hemoglobina [g/dL]	13,92 ± 3,13 (9,5 – 17,9)	13,95 ± 3,16 (9,7 – 20,1)	0,9818
Plaquetas [$\times 10^3/\mu$ L]	201,54 ± 150,89 (23,0 – 599,0)	288,30 ± 158,50 (80,0 – 531,0)	0,2050
Leucócitos totais [/ μ L]	14.880 ± 7.290 (6.000 – 29.600)	20.980 ± 10.120 (5.600 – 35.100)	0,1329
Neutrófilos totais [/ μ L]	8.680 ± 6.379 (2.232 – 23.680)	12.384 ± 6.275 (2.520 – 23.478)	0,1960
Neutrófilos imaturos [/ μ L]	888 ± 1.098 (60 – 2.912)	879 ± 643 (152 – 2.160)	0,2908
Neutrófilos segmentados [/ μ L]	7.792 ± 5.425 (2.160 – 21.016)	11.505 ± 6.065 (2.352 – 22.659)	0,174
Índice neutrofílico	0,05 ± 0,03 (0,02 – 0,09)	0,05 ± 0,04 (0,01 – 0,12)	0,7564
Linfócitos totais [/ μ L]	5.070 ± 3.550 (900 – 13.090)	7.290 ± 6.040 (1.900 – 19.070)	0,4813
Linfócitos T [CD3*] (/ μ L)	4.090 ± 2.610 (530 – 9.770)	5.590 ± 4.620 (870 – 14.970)	0,6727
Linfócitos B [CD19*] (/ μ L)	810 ± 970 (120 – 2.810)	1.170 ± 2.100 (100 – 7.400)	0,5973
Linfócitos Helper [CD4*] (/ μ L)	3.020 ± 2.070 (340 – 7.380)	3.890 ± 3.320 (570 – 10.610)	0,7782
Linfócitos Citotóxicos [CD8*] (/ μ L)	1.010 ± 619 (190 – 2.120)	1.590 ± 1.330 (360 – 4.290)	0,3981
[CD4+ / CD8*]	3,1 ± 1,36 (1 – 5,4)	2,6 ± 1,32 (1,4 – 5,3)	0,4548
PCR	13,0 ± 8,8 (6,0 – 24)	38,0 ± 30,7 (12 – 96,0)	0,041
Natural Killer (/ μ L)	32 ± 20 (10 – 70)	120 ± 89 (10 – 290)	0,0124

DISCUSSÃO

A sepse neonatal é um problema grave e de grande importância para os neonatologistas intensivistas, acarretando alta morbi-mortalidade nas crianças recém-nascidas. Embora a literatura tenha relatos de estudos de vários parâmetros hematológicos quanto a possível associação de alguns deles com o quadro séptico, até o presente momento nenhum parâmetro estudado parece revelar um valor prognóstico confiável da doença. O presente trabalho avaliou múltiplos parâmetros hematológicos, celulares e da PCR, em recém-nascidos sépticos e crianças saudáveis, objetivando constatar as possíveis diferenças naqueles parâmetros que melhor se relacionem com a ocorrência e evolução da doença séptica neonatal.

Nas análises da série vermelha dos neonatos sob investigação, os valores de hemácias, hemoglobina e hematócrito estavam dentro das faixas de normalidade, tanto nos sépticos quanto nos saudáveis; o que sugere que a anemia não esteve presente, como um possível fator agravante, nas crianças sépticas (Tabela 1). A avaliação quantitativa das plaquetas foi considerada importante em pacientes com sepse por Solla, Vecchio, Rimsza²⁹, sendo a trombocitopenia apontada como um achado hematológico precoce da doença. Para esses autores, o quadro de trombocitopenia de $<100 \times 10^3/\mu\text{L}$ é encontrado em 55% a 65% dos sépticos; porém a contagem de $<150 \times 10^3/\mu\text{L}$ é vista em 80% dos neonatos. Lokeshwar *et al*²⁰, associaram a trombocitopenia no neonato séptico ao aumento da trombopoetina (>1000 pg/ml), o que parecia diminuir a massa de megacariócitos na medula de alguns pacientes. Porém no presente estudo, as contagens médias das plaquetas das crianças sépticas e não-sépticas se apresentaram dentro da faixa de normalidade (Tabelas 1 e 3). O quadro de plaquetopenia foi observado em apenas num controle e em três do grupo séptico, sendo dois deles evoluídos ao óbito. Estes resultados parecem sugerir que a incidência e evolução da sepse do RN não dependem de alterações quantitativas das plaquetas sanguíneas.

As contagens total e diferencial dos leucócitos, associadas aos achados clínicos e dados laboratoriais, são rotineiramente utilizados nos hospitais como dados importantes na avaliação do quadro séptico em crianças e adultos. Na contagem leucocitária total, os grupos casos e controles revelaram diferença significativa, com o valor médio maior no grupo séptico (Tabela 1). Entre os sépticos, o quadro de leucocitose foi mais intenso nos pacientes que foram ao óbito (média de $20.980/\mu\text{L}$), em comparação ao dos que responderam ao tratamento ($14.880/\mu\text{L}$) (Tabela 3). Estes resultados são comparáveis aos de Godula *et al*⁹ em RNs sépticos, o que poderá sugerir que o aumento muito significativo dos leucócitos totais se relaciona, possivelmente, com o pior prognóstico nas crianças sépticas. Porém, estes dados estão de desacordo com os de Tollner²⁶, que considerou a leucopenia um achado hematológico relevante no diagnóstico precoce dos RN gravemente doentes.

No grupo controle, os neutrófilos totais apresentaram variação concordante com os descritos por Manroe *et al*.¹⁸, enquanto no grupo de sépticos essa variação foi mais ampla (Tabela 1). Entre os RN sépticos que foram ao óbito, a maioria apresentou neutrofilia (7 dos 11), em comparação com apenas 2 dos 10 que responderam ao tratamento (Tabela 3). Segundo Lewin³⁰, recém nascidos sépticos com granulocitopenia têm o pior prognóstico, com o risco de mortalidade em cerca de 90%, principalmente se o estoque de neutrófilos da medula óssea é depletado para $<7\%$ do total de células nucleadas. Segundo esse autor, o índice neutrofilico de

$>0,8$ correlaciona com depleção do estoque medular de neutrófilos e, conseqüentemente, com a gravidade da sepse. No presente trabalho, o quadro de granulocitopenia não foi constatado, tendo os recém-nascidos respondidos à infecção bacteriana com leucocitose e neutrofilia, sem aumento das formas imaturas. É possível especular que esta boa resposta leucocitária tenha contribuído ao sucesso do tratamento de 10 dos 21 (47,5%) dos neonatos sépticos.

A contagem absoluta de linfócitos no sangue periférico é mais elevada em neonatos e crianças, quando comparada com o adulto^{9,31}. Os valores encontrados no grupo controle estão de acordo com os dados desses autores. Os neonatos com sepse apresentaram uma variação mais ampla dos valores dos linfócitos (Tabela 1), do que os relatados por Godula-Stuglik *et al*.⁹; entretanto, os valores médios dos nossos dados são concordantes com os do autor. Diferentemente dessas observações, Sofatzis *et al*.³² relataram um quadro significativo de linfocitopenia nos neonatos sépticos.

Nas análises imunofenotípicas dos linfócitos T dos RN sépticos e dos controles, encontrou-se valores superiores nos sépticos, devido à elevação da subpopulação T CD4+ (Tabela 2). Os pacientes sépticos que foram ao óbito revelaram valores de linfócitos T superiores aos dos sépticos que responderam ao tratamento (Tabela 3), o que pode sugerir que esta célula não desempenhou papel protetor significativo na sepse. Os valores dos linfócitos B dos RN controle (Tabela 2) se encontram de acordo com aqueles relatados na literatura^{9,33}. Entretanto, no presente estudo os valores da célula B dos sépticos apresentaram-se mais elevados, em relação aos do grupo controle, do que relatados por esses autores. Weinschenk, Farina e Bianchi³⁴, observaram elevação da expressão de CD19 (célula B) nos RN doentes e concluíram que esta alteração, bem como a elevação de CD33 (células mielóides) e de CD66 (neutrófilos), teriam valor preditivo na sepse. A elevação dos valores de T CD4+ e da célula B poderá sugerir o desencadeamento das respostas imunes adaptativas frente a um quadro grave de sepse. Todavia, o reduzido número de pacientes que podíamos avaliar no presente estudo, bem como a elevação apenas moderada da célula B (CD19), não permitiram estimar o valor preditivo desse parâmetro na sepse neonatal.

O valor médio da célula NK nos RN controle estava abaixo dos valores normais relatados por outros autores^{9,31}. Nos RNs sépticos, os valores de células NK mostraram-se muito abaixo do valor médio observado no grupo controle, com diferença estatisticamente significativa entre as médias ($p=0,0041$, Tabela 1), o que se encontra de acordo com o relatado por Godula-Stuglik *et al*.⁹ Entretanto, o valor médio de NK dos pacientes sépticos do presente estudo encontra-se em patamar inferior ao valor relatado pelo este autor.

A redução significativa das células NK nos RN sépticos, em relação aos controles, parece sugerir que a deficiente atuação desta célula podia ter contribuído para a evolução da sepse neonatal. Porém, a análise dos dados dos subgrupos de sépticos com óbito e sépticos que responderam ao tratamento parece contradizer tal interpretação, haja vista que os sépticos que foram ao óbito revelaram um valor médio significativamente maior de NK, do que o observado para o subgrupo que respondeu ao tratamento ($p=0,0124$; Tabela 3). Não pudemos encontrar uma explicação plausível para a elevação do NK nos sépticos que evoluíram para óbito. A pequena amostra de sépticos disponível para estudo quanto a resposta favorável ou não ao tratamento, não nos permite considerar que a elevação de NK no subgrupo que evoluiu para óbito tenha revelado uma tendência muito confiável, tampouco podemos atribuir à célula NK o papel

de ter contribuído ao agravamento do quadro séptico. Elevação significativa nos valores de PCR foi evidenciada nos pacientes sépticos do presente estudo, o que concorda com a observação de Chiesa *et al*²⁴. Por ser a PCR da corrente sanguínea um conhecido indicador do processo inflamatório sistêmico em progressão, a maior elevação deste parâmetro nos pacientes sépticos que foram ao óbito, em comparação daqueles que responderam ao tratamento, parece apenas comprovar o agravamento do processo infeccioso no primeiro subgrupo (Tabela 3). Com exceção das elevações significativas nos leucócitos totais e nos valores séricos da PCR, nenhum dos demais parâmetros celulares hematológicos estudados parecem sofrer alterações significativas consistentes durante a sepse neonatal, a ponto de podermos atribuir a eles algum valor etiopatogênico na ocorrência desta grave doença do recém-nascido. Diante desta constatação, é possível especular que possíveis alterações funcionais quali-quantitativas nos linfócitos T e B, em particular nas subpopulações do TCD4+ geradoras de citocinas que modulam defesas distintas, revelem alguma relação mais direta na incidência da sepse em recém-nascidos. Tais avaliações não foram objeto do presente estudo.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos especiais a Profa. Maria Salani Mota do Departamento de Matemática e Estatística da Universidade Federal do Ceará pela valiosa ajuda nas análises estatísticas de dados e a Carlos Eduardo Alves Batista pela assistência na coleta de dados.

REFERÊNCIAS

- Klein, J. O.; Marcy, S. M. Bacterial sepsis and meningitis. In: Infectious diseases of the fetus and newborn infant. 6th. ed. Remington, J. S.; Klein, J. O. (Eds.). Philadelphia: W.B. Saunders, 1995. v.1: 835-890.
- Parravicini, E.; Van de Ven, C.; Anderson, L.; Cairo, M.S.; Myeloid hematopoietic growth factors and their role in prevention and/or treatment of neonatal sepsis. *Transf. Med. Rev.* 16:11-24. 2002.
- Mohan, P.; Brocklehurst, P. Granulocyte transfusions for neonates with confirmed or suspected sepsis and neutropenia. *Cochrane Database Syst Rev.* 4:CD 003956. 2003
- Carneiro-Sampaio, M. M. S.; grumach, A. S. Peculiaridades da resposta imune do recém-nascido. In: Infecções congênitas e perinatais. Diniz, E. M. A.; Vaz, F. A. C. (Ed.). São Paulo: Atheneu, 1991:1-14.
- Levi, O.; Martin, S.; Eichenwald, E.; Ganz, T.; Valore, E.; Carroll, S. F.; Lee, K.; Goldmann, D.; Thorne, G. M., Impaired innate immunity in the newborn: newborn neutrophils are deficient in bactericidal/permeability-increasing protein. *Pediatrics.* 104:1327-1333. 1999.
- Erdman, S. H.; Christensen, R. D.; Bradler, P. P.; Rothstein, G. Supply and release of storage neutrophil. *Biol. Neonate.* 41:132-137, 1982.
- Cairo, M. S. Neonatal neutrophil host defense. *Am. J. Dis. Child.* 143:40-46. 1989.
- John, B. I. Linfócitos T e células Natural Killer. In: *Imunologia médica*. STITES, D. P.; TERR, A. I.; PARSLow, T. G. (Ed.). 9a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000:101-112.
- Godula-Stuglik, U.; Mazur, B.; Mikusz, G.; Torbus, T.; Tomanek, L. Lymphocyte subpopulations full-term septic neonates. *Pediatr. Int.* 41:500-505. 1999.
- Uthaisangsook, S.; Day, N. K.; Bahna, S. L.; Good, R. A.; Haraguchi, S. Innate immunity and its role against infections. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*88:253-264. 2002.
- Lewis, D. B.; Wilson, C. B. Developmental immunology and role of host defenses in neonatal susceptibility to infection. In: *Infectious diseases of fetus and newborn infant*. 4th Ed. Remington, J. S.; Klein, J. O. (Eds.). Philadelphia: W.B. Saunders. 1995:20-98.
- Yoder, M. C.; Polin, R. A. In: *Neonatal Perinatal Medicine: diseases of the fetus and infants*. Fanaroff, A. A; Martin, R. J. (Eds). 6th Ed. St. Louis, Mosby

Year Book, 1997:685-811.

- Bonadio, W. A.; Hennes, H.; Smith, D. Reability of observation variables in distinguishing infectious outcome of febrile young infants. *Pediatr. Inf. Dis. J.*12:11-19. 1993.
- Escobar, J. E. Effect of the systemic inflammatory response on biochemical markers of neonatal bacterial infection: a fresh look at old confounders (Editorials). *Clin. Chem.* 49:21-22.2003.
- Fanaroff, A. A.; Martin, R. J. In: *Neonatal perinatal medicine: diseases of the fetus and infants*. 6th ed. St. Louis: Mosby Year Book, 1997. v. 1:722-725.
- Klein, J. O.; Marcy, S. M. Bacterial sepsis and meningitis. In: *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. 3rd ed. Remington J. S.; Klein, J. O. (Eds.). Philadelphia: WB Saunders, 1990: 602-622.
- Hammerberg, O.; Bialkowska-hobranska, H.; Gregson, D.; Potters, H.; Goupaul, D.; Reid, D., Comparison of blood cultures with corresponding venipuncture site cultures of specimens from hospitalized premature neonates. *J. Pediatr.*120:120-124. 1992.
- Manroe, B. L.; Weinberg, A. G.; Rosenfeld, C. R.; Browne, R. The neonatal blood count in health and disease: 1. Reference values for neutrophilic cells. *J. Pediatr.*95:89-98. 1979.
- Ghosh, S.; Mittal, M.; Jaganathan, G., Early diagnosis of neonatal sepsis using a hematological scoring system. *Ind. J. Med. Sci.*55:495-500. 2001.
- Lokeshwar, M. R.; Bavdekar, M.; Kulkarni, S.; Shah, N. Neonatal thrombocytopenia – a challenge. Disponível em: <http://www.pediatriconcall.com/for-doctor/pediatric-analysis/pediatric-analysis.asp>. Acesso em: 29.04.2001.
- Vincent, J. L.; Yagushi, A.; Pradier, O. Platelet function in sepsis. *Crit. Care Med.*30:S313-S317. 2002.
- Clyne, B., Olshaker, J.S., The C-reactive protein. *J. Emerg. Med.*17:1019-25. 1999.
- Caksen, H.; Kurtoglu, S.; Hallac, I. K.; Ustunbas, H. B.; Uzum, K.; Kilic, H. The relationship between scoring systems and cytokine levels in neonatal sepsis. *Ann. Acad. Med (Singapore)*. 32:418-20. 2003.
- Chiesa, C.; Pellagrini, G.; Panero, A.; Osborn, J. F.; Signore, F.; Assumma, M.; Pacifico, L. C-reactive protein, interleukin-6, and procalcitonin in the immediate postnatal period: influence of illness severity, risk status, antenatal and prenatal complications, and infection. *Clin. Chem.* 49:60-68. 2003.
- Hengst, J. M. The role of C-reactive protein in the evaluation and management of infants with suspected sepsis. *Adv. Neonatal Care.*3:3-13. 2003.
- Tollner, U. Early diagnosis of septicemia in the newborn. Clinical studies and sepsis score. *Eur. J. Pediatr.* 138:331-337. 1982.
- Küster, H.; Weiss, M.; Willeitner, A. E.; Detlefsen, S.; Jeremias, I.; Zbojan, J.; Geiger, R.; Lipowsky, G.; Simbruner, G. Interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-6 for early diagnosis of neonatal sepsis 2 days before clinical manifestation. *Lancet.*352:1271-1277. 1998
- Martius, J. A. Risk factors associated with early-onset sepsis in premature infants. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*85:151-158. 1999.
- Sola, M. C.; Del Vecchio, A.; Rimsza, L. Evaluation and treatment of thrombocytopenia in the neonatal intensive care unit. *Clin. Perinatol.*27:655-679. 2000.
- Lewin, E.B. Pediatric infectious diseases. In: *The Merck Manual*. 17th ed., Rahway, N. J. Ed. Merck & Co. Inc. 1997.
- Vries, E.; Bruin-Versteeg, B.; Comans-Bitter. Longitudinal survey of lymphocyte subpopulations in the first year of life. *Pediatr. Res.*47:528-537. 2000.
- Sofatzis, P.; Mexi, B. P.; Lioussis, G.; Driva, I.; Alexia, S.; Costales, C. Lymphocytes subpopulations in neonatal sepsis. *Perinatal Neonatal Med.*1(s1):215. 1996.
- Erkeller-Yuksel, F. M.; Deneys, V.; Yuksel, B. Age-related changes in human blood lymphocyte subpopulations. *J. Pediatr.*120:216-222. 1992.
- Weinschenk, N. P.; Farina, A.; Bianchi, D. W. Premature infants respond to early-onset and late-onset sepsis with leukocyte activation. *J. Pediatr.*137:345-350. 2000.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Dra. Alaide da Silva Pitombeira
Rua Min Joaquim Bastos, 231/apto. 502 (FÁTIMA)
CEP: 60415-040. FORTALEZA – CEARÁ
TEL: (85) 3257 5054 FAX: 3288 8316
E-MAIL: alaide.pitombeira@saude.gov.br

Avaliação de concentrados plaquetários produzidos pelo serviço de Hemoterapia do Hospital Santo Ângelo: implantação de um sistema de controle de qualidade

Evaluation of the platelet concentrates produced for the Hemotherapy Service of Santo Ângelo Hospital: Implantation of a system of quality control

Giliane Dorneles Guerin¹ & Lisiane Piltz Burtet²

RESUMO - A utilização de hemocomponentes constitui-se atualmente numa modalidade terapêutica de fundamental importância no exercício da medicina transfusional. Dentre os diversos hemocomponentes que podem ser utilizados, o concentrado de plaquetas (CP) é de grande utilização em situações de distúrbios hemorrágicos, e devem ser coletados, processados e transfundidos sob a mais elevada qualidade, proporcionando segurança transfusional. Sobre estas condições, o objetivo deste trabalho foi implantar um sistema de controle de qualidade nos concentrados plaquetários produzidos pelo Serviço de Hemoterapia do Hospital Santo Ângelo e avaliar os resultados obtidos. Foram incluídas na pesquisa 24 unidades de concentrados plaquetários *Standard*. Procedeu-se a análise quantitativa, qualitativa, pH e estudo bacteriológico das mesmas. Constatou-se a ausência de: crescimento bacteriano, fragmentação plaquetária, agregação plaquetária e pH ácido. Com relação ao número de plaquetas, este se manteve satisfatório até o quinto dia. Os resultados obtidos demonstraram a conformidade das unidades fracionadas pelo Serviço de Hemoterapia com a legislação vigente. Para obter um controle de qualidade mais rígido, recomendamos a execução da avaliação da presença de fragmentação plaquetária, agregação plaquetária e integridade funcional.

PALAVRAS-CHAVE - Concentrados Plaquetários – Controle de Qualidade – segurança transfusional

SUMMARY - The use of hemocomponents is nowadays a crucially important therapeutic modality in the exercise of transfusional medicine. Among the various hemocomponents employed, the platelet concentrate (PC) is indicated in cases of hemorrhagic disturbances and must be collected, processed and managed under the highest level of care, providing transfusional security. Under these conditions, the objective of this work was to implement a quality control system in the platelet concentrates produced by the Hemotherapy Service of Santo Ângelo Hospital as well as to evaluate the obtained results. The methods consisted of quantitative, qualitative analysis, pH and bacteriological study of the 24 units of Standard platelet concentrates. It was concluded absence of: bacterial growth, platelet aggregation, acid pH and platelet fragmentation. In relation to the number of platelet, the study showed that it was kept at a satisfactory level up to the fifth day. The evaluation of the platelet functional integrity is more representative in the fifth day. The results have also demonstrated the conformity of the units of platelet concentrates produced by the Hemotherapy Service with the current law. In order to get a more rigid control of the process, we recommend the execution of the evaluation of the presence of fragmentation platelet, aggregation platelet and functional integrity.

KEYWORDS - Platelet concentrates, quality control, transfusional security.

INTRODUÇÃO

As plaquetas são pequenas células discóides anucleadas, originadas da fragmentação do citoplasma dos megacariócitos medulares, sendo constituintes normais do sangue periférico⁽¹⁾. Sua principal função, quando ativadas, é promover uma superfície hemostática nos vasos sanguíneos, no qual ocorrerá a formação da rede de fibrina, contribuindo para o processo de coagulação. Deficiências no número e/ou na função plaquetária podem causar anormalidade nas vias da coagulação, tornando necessária à reposição de plaquetas⁽⁵⁾. Esta reposição acontece através da transfusão de concentrado de plaquetas, o qual é obtido através de dupla centrifugação de uma unidade de sangue total coletada de veia periférica de um doador⁽³⁾.

As indicações clínicas para a transfusão de plaquetas são para prevenir ou controlar distúrbios hemorrágicos em pacientes com baixas contagens de plaquetas (trombocitopenias), ou, menos freqüentemente, em pacientes com disfunções plaquetárias qualitativas (trombocitopatias)⁽¹⁴⁾. A transfusão plaquetária pode ser classificada em profilática ou terapêutica conforme a situação clínica e laboratorial de cada paciente⁽⁵⁾.

TABELA I

Número de plaquetas e características dos pacientes trombocitopênicos que podem beneficiar-se da administração profilática de plaquetas.

Quadro com características para administração profilática	
Plaquetas (mm ³)	Características dos pacientes
< 10.000	Estáveis, sem sangramento
< 20.000	Instáveis ou sem observação constante
20.000 – 50.000	Com indicação de procedimento cirúrgico caso apresente trombocitopenia dilucional e contagem de plaquetas < 50.000
< 100.000	Com indicação de cirurgia cardíaca ou neurológica
50.000	Recém nascidos prematuros estáveis
100.000	Recém nascidos prematuros com patologias diversas (risco associado)

Quanto às transfusões terapêuticas, estas são indicadas no controle de sangramento associado a trombocitopenia (geralmente com contagem plaquetária menor que 20.000/mm³), nas alterações da função plaquetária em pacientes com sangramento (trombocitopenia) a indicação depende da contagem plaquetária, na púrpura trombocito-

Recebido em 16/11/2005
Aprovado em 20/09/2006

¹Acadêmica do curso de Farmácia Bioquímica Clínica, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Campus de Santo Ângelo (URI).

²Pós graduada em Hematologia Clínica e Análises Clínicas, professora das disciplinas de Hematologia Clínica e Controle de Qualidade em Análises Clínicas do curso de Farmácia Bioquímica Clínica, Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Campus de Santo Ângelo (URI).

pênica imune (PTI) quando há sangramentos intensos ou hemorragias intracranianas, e na coagulação intravascular disseminada (CIVD) a transfusão de plaquetas pode ser necessária em pacientes com sangramento ativo, com a necessidade de monitoramento⁽⁹⁾.

As contra-indicações da transfusão plaquetária são nos casos de púrpura trombocitopênica trombótica (PTT), na Síndrome hemolítico-urêmica (SHU) e nas plaquetopenias induzidas por heparina, pois nestes casos as plaquetas infundidas podem piorar as complicações trombóticas associadas a estes eventos⁽⁵⁾.

O sangue e seus componentes devem ser coletados, processados e transfundidos sob a mais elevada qualidade. Sendo assim, o Ministério da Saúde, no âmbito da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), tem desenvolvido estratégias para a avaliação da qualidade dos Serviços Hemoterápicos e do cumprimento da legislação pertinente, conforme a Resolução da Diretoria Colegiada RDC n° 343, de 13 de dezembro de 2002. Tal resolução atribui que os Serviços de Hemoterapia devem ter protocolos escritos, definindo o tipo de controle a ser feito em cada hemocomponente e os parâmetros mínimos esperados para cada item controlado. Sendo assim, o concentrado plaquetário obtido a partir de sangue total deverá conter no mínimo $5,5 \times 10^{10}$ plaquetas por bolsa. As plaquetas deverão estar suspensas em volume suficiente de plasma (50 a 70 ml), de tal maneira que o pH se mantenha na faixa de 6,5 a 7,4⁽⁸⁾.

Para a garantia da eficácia clínica, também se faz necessário que os concentrados plaquetários sejam conservados entre 20-24°C. Estes deverão ser obtidos em sistema fechado e mantidos sob agitação contínua, em agitador próprio para este fim. A validade varia entre 3 a 5 dias, dependendo do tipo de bolsa plástica utilizada e de acordo com as especificações do fabricante. Como perdem sua viabilidade muito rapidamente durante o período de armazenamento, há necessidade de uma renovação constante do estoque⁽³⁾. Na avaliação da qualidade dos concentrados plaquetários, tem sido aconselhada a determinação não só do conteúdo celular como da integridade funcional. A alteração da forma por conversão disco => esfera tem sido associada por alguns autores ao valor da diferença do volume plaquetário médio (dVPM), uma vez que apenas as plaquetas discóides respondem ao EDTA com tumefação, levando ao aumento do VPM⁽⁸⁾. A dVPM tem sido usada na avaliação quantitativa da lesão de armazenamento, revelando-se um teste sensível e reproduzível e tem a vantagem de ser facilmente padronizada e requerer um pequeno volume de amostra. Segundo alguns resultados publicados, existe uma boa correlação entre o dVPM e outros testes da função plaquetária⁽¹⁰⁾. É possível a verificação da presença de agregação das plaquetas nas unidades de concentrados plaquetários através de um protocolo que consiste na determinação da diferença no número de plaquetas (dPLT), sendo a $dPLT = PLT(EDTA) - PLTi$, onde $PLT(EDTA)$ é o número de plaquetas no tubo com EDTA e $PLTi$ o número de plaquetas inicial no tubo sem EDTA⁽¹³⁾.

A atividade metabólica das plaquetas continua durante o armazenamento, e mesmo sob condições que garantam a viabilidade necessária para que a atividade hemostática se mantenha ótima, como temperatura adequada, agitação constante, trocas gasosas e volume da suspensão plaquetária na unidade, há sempre plaquetas que entram em exaustão metabólica, devido à falta de oxigênio imprescindível a fosforilação oxidativa. Quando há um excesso de plaquetas, o oxigênio é rapidamente consumido e a via metabólica passa a ser a via anaeróbia, com produção de

lactato e CO₂, o que conduz à produção de ácido carbônico e, conseqüentemente, à diminuição do pH do meio⁽¹⁾.

Os concentrados plaquetários obtidos do plasma rico em plaquetas são altamente heterogêneos quanto ao conteúdo celular, devido às diferenças fisiológicas entre os doadores de sangue em relação ao número de plaquetas e ao hematócrito, e quanto à estabilidade no armazenamento⁽¹⁾.

Em meio ácido, a plaqueta perde a forma discóide e sofre fenômenos de desgranulação, perdendo a integridade funcional. Há um aumento na permeabilidade da membrana plaquetária, originando um desequilíbrio osmótico, que leva a um aumento do volume plaquetário médio (VPM) e a plaqueta passa a ter forma esférica⁽¹⁾.

Por outro lado, também é descrito que, em meio ácido, as plaquetas sofrem fragmentação celular, o que pode originar contagens plaquetárias falsamente elevadas. As plaquetas fragmentadas aparecem menores, desgranuladas, tendo geralmente um VPM inferior a 5,5 fl, o que contraria o aumento de VPM devido à passagem da forma discóide à forma esférica⁽¹⁾.

Outra causa de aumento da atividade metabólica num concentrado plaquetário em armazenamento é a contaminação da unidade por microrganismos⁽¹⁾. Vários autores citam a preocupação especial com este interferente devido à estocagem deste à temperatura ambiente.

A ocorrência de bacteremia associada às transfusões sanguíneas passou a assumir um papel de destaque na medicina transfusional, devido ao aumento de sua frequência⁽⁶⁾.

A bacteremia assintomática no momento da doação, infecções no período de incubação ou de convalescença, que não são referidas pelo candidato durante a triagem clínica, podem ser a principal causa de uma possível contaminação bacteriana da unidade de sangue coletada⁽¹²⁾. Embora esta contaminação nem sempre tenha tradução clínica evidente sob a forma de reação transfusional, os receptores podem manifestar na maior parte dos casos, febre, tremores, taquicardia, alterações da pressão arterial, náuseas e vômitos, taquipnéia e dor lombar, podendo levar rapidamente ao choque. Estudos efetuados têm demonstrado uma incidência de culturas positivas, na ausência de bacteremia, entre 2 a 6%⁽⁹⁾.

Conforme as especificações da RDC 343(2002), cada item verificado pelo controle de qualidade deve apresentar um percentual de conformidade superior a 75%, à exceção da esterilidade, que deverá apresentar conformidade superior a 95%. Sobre estas condições, o objetivo deste trabalho foi implantar um sistema de controle de qualidade nos concentrados plaquetários produzidos pelo Serviço de Hemoterapia do Hospital Santo Ângelo, RS, e avaliar os resultados obtidos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado um estudo epidemiológico, transversal, prospectivo e observacional. As amostras foram obtidas através das unidades de plaquetas produzidas no período de janeiro até abril de 2005. Na análise de registros do Serviço de Hemoterapia do Hospital Santo Ângelo se constatou que a partir do dia 03.01.05 até 29.04.05 houve coleta de 222 unidades plaquetárias.

Do total das amostras, foram incluídas na pesquisa 24 unidades de concentrados plaquetários Standard (que correspondem 10,9% do total produzido neste período) segundo o critério estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, que preconiza que sejam incluídos no controle de qualidade, no mínimo 10 unidades do total coletado pelo serviço hemoterápico ou 1% deste total, o que for maior.

Tais concentrados plaquetários foram provenientes de coletas efetuadas em doadores benévolos de sangue, obtidos a partir da centrifugação do sangue total e analisados no primeiro e no quinto dia a partir da coleta, que consiste no prazo máximo de validade destes. As amostras foram selecionadas aleatoriamente.

Abaixo, segue explanado o fluxograma operacional da rotina de funcionamento do Serviço de Hemoterapia do Hospital Santo Ângelo, com ênfase no período que compreende desde a triagem clínica até a estocagem dos hemocomponentes produzidos, sendo que neste momento efetuou-se o controle de qualidade nos concentrados plaquetários. Cabe ressaltar que as bolsas utilizadas para controle de qualidade foram violadas após seu uso, e por este motivo não utilizadas para transfusão.

Com base nos critérios de inclusão, se considerou aceitáveis somente aquelas amostras de concentrados plaquetários preparados a partir de sangue total do doador aprovado na triagem clínica e laboratorial, estando desta forma, de acordo com as especificações exigidas pela legislação vigente, no que concerne aos critérios transfusionais. Não foram incluídos no estudo, unidades com agregados plaquetários grosseiramente visíveis.

Os concentrados plaquetários foram coletados em bolsas da marca Fresenius Hemocare® contendo o anticoagulante CPDA (citrato – fosfato – dextrose – adenina). Após a obtenção do concentrado plaquetário, estes foram armazenados em agitador vertical, sob homogeneização constante, na sala de preparação de hemocomponentes, com temperatura local monitorada e registrada a cada 4 horas por um técnico responsável.

As variáveis analisadas foram: cor da unidade, presença de grumos, lipemia, presença de fibrina, volume do concentrado, análise quantitativa e qualitativa das plaquetas no primeiro e quinto dia após a coleta, pH e estudo bacteriológico. Para a análise da cor do concentrado plaquetário, presença de grumos visíveis, lipemia e presença de fibrina foi realizada a análise macroscópica da unidade, e o volume total destas foi obtido através da pesagem em balança analítica.

Cabe ressaltar que todas as bolsas de concentrados plaquetários devem passar por inspeção visual em todos os momentos, desde a preparação até o armazenamento e antes de serem liberadas para transfusão. A visualização de qualquer alteração nos aspectos mencionados na tabela 2 indica que a bolsa de hemocomponentes deve ser descartada e o processo de obtenção e armazenamento avaliado com o objetivo de identificar as possíveis causas e propor medidas corretivas.

Quanto à análise quantitativa e qualitativa das plaquetas, pH e estudo bacteriológico, as amostras foram obtidas através da punção da bolsa plástica onde se efetuou a assepsia local desta unidade com álcool 70% e algodão, e com agulha e seringa estéril foram retirados 3ml do concentrado plaquetário devidamente homogeneizado. Em um tubo de polipropileno intitulado com o número 1, se adicionou 1 gota de anticoagulante EDTA (Labtest Diagnóstica?) e a este, 0,6ml da suspensão plaquetária. Em outro tubo de polipropileno seco, intitulado com o número 2, se adicionou 2 ml da mesma suspensão plaquetária, e em seguida, com o auxílio de um papel indicador PII 0-14 Merck? determinou-se o pH da amostra.

TABELA II
Análise macroscópica dos concentrados plaquetários e seus valores de referência

ANÁLISE MACROSCÓPICA	
Cor da unidade	Amarelo claro
Presença de grumos	Ausentes / Raros
Presença de fibrina	Ausente
Presença de lipemia	Ausente

Ambos os tubos foram colocados em homogeneizador por uma hora. Após o cumprimento do tempo de homogeneização, se procedeu a leitura dos tubos 1 e 2 no contador automático Sysmex KX-21N.

O volume restante na seringa foi encaminhado ao setor de Bacteriologia, onde se realizou a semeadura por esgotamento da suspensão plaquetária em ágar sangue de carneiro a 5%, com posterior incubação da cultura por 24 horas a 35°C.

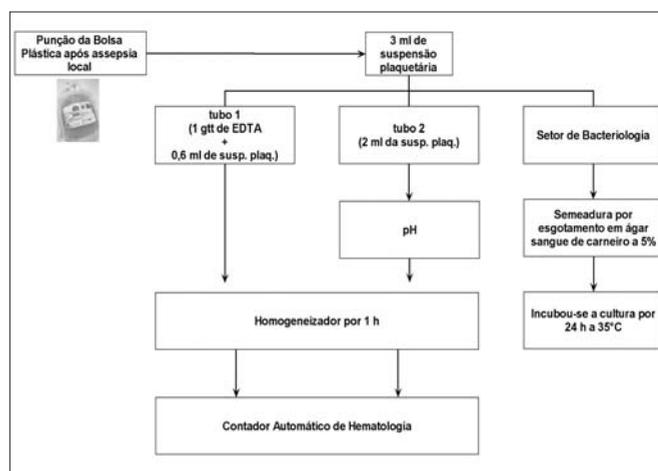


Figura 2: Esquematização da técnica executada para avaliação qualitativa, quantitativa, bacteriológica e do pH dos concentrados plaquetários

Foi elaborado um mapa de registro dos resultados para cada unidade. Para a análise quantitativa das plaquetas efetuou-se a aplicação de testes não paramétricos de amostras pareadas com nível de significância de 5% (teste t de Student) no número de plaquetas do primeiro e quinto dia (com EDTA). Para as análises qualitativas, executou-se a aplicação do teste t de Student nas relações (abaixo designadas) para verificar a integridade funcional e a presença de agregação plaquetária. Testes paramétricos tradicionais foram aplicados quando houve necessidade de avaliar o comportamento de algumas variáveis como pH, contaminação bacteriana e presença de fragmentação plaquetária.

TABELA III
Avaliação qualitativa dos concentrados plaquetários através da relação de variáveis que caracterizam a integridade funcional, presença de agregação e fragmentação plaquetária.

ANÁLISE QUALITATIVA	
Integridade funcional	dVPM = VPM (EDTA) – VPM (sem EDTA)
Presença de agregação plaquetária	dPLT = PLT (EDTA) – PLT (sem EDTA)
Presença de fragmentação	VPM < 5,5 = Sugestivo de fragmentação plaquetária.

RESULTADOS

Das 24 unidades de plaquetas analisadas para o controle de qualidade, todas amostras (100%) submetidas ao estudo bacteriológico apresentaram resultado negativo. Estas amostras foram analisadas no primeiro dia de coleta.

Com base na aferição do pH dos concentrados plaquetários no primeiro dia e no quinto dia, constatou-se que nenhuma unidade obteve um pH ácido, sendo que a média dos valores no primeiro dia foi de 7,8 e no quinto dia foi de 8,0, resultados estes conforme a RDC 343/02 que preconiza que o pH se encontre, no mínimo, 6,5 no último dia de validade do produto (tabela 4).

TABELA IV
Média do pH no primeiro e quinto dia após a coleta do CP.

pH	1º dia	5º dia
Média	7.8	8.0

Com relação ao número de plaquetas, verificou-se que no primeiro dia (com EDTA) a média obtida correspondeu a 28 x 1010 plaquetas por bolsa, com um desvio padrão de $\pm 1,479 \times 1010$. No quinto dia, a média obtida foi de 20 x 1010, com um desvio padrão de $\pm 1,408 \times 1010$.

Ao relacionar os valores de primeiro e quinto dia de coleta, com uso de EDTA, constatou-se através da aplicação do Teste t, não haver diferença significativa entre as médias, o que significa que o número de plaquetas se mantém satisfatório até o quinto dia (Tabela 5).

TABELA V
Teste t para comparação dos valores do conteúdo plaquetário no primeiro e no quinto dia.

Teste t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes com EDTA	
Stat t	2,010714964
t crítico bi-caudal	2,012893674

Para o estudo do estado de fragmentação plaquetária se determinou o VPM, no tubo sem EDTA, no primeiro e no quinto dia, observando-se que no primeiro dia nenhuma unidade de concentrado plaquetário apresentou VPM inferior a 5,5 fentolitros (fl), tendo-se obtido uma média dos valores correspondente a 7,0 fl e desvio padrão de $\pm 0,60$ fl. Da mesma forma, no quinto dia, nenhuma unidade analisada apresentou um VPM inferior a 5,5 fl, tendo-se obtido uma média dos valores correspondente a 7,7 fl e desvio padrão de $\pm 0,64$ fl. Estes resultados demonstram a ausência de fragmentação nas plaquetas estudadas e são demonstrados na tabela 6.

TABELA VI
Média e desvio padrão do VPM no 1º e 5º dia após a coleta

	VPM do Concentrado plaquetário sem EDTA (em fl)
1º dia	7 \pm 0,60
5º dia	7,7 \pm 0,64

Quando observamos o estado de agregação plaquetária, de acordo com os valores obtidos na aplicação do Teste t, infere-se que não há diferença estatisticamente significativa entre as amostras, ao compararmos a diferença da primeira leitura (com EDTA) e a segunda leitura (sem EDTA) no primeiro e no quinto dia (tabela 7).

TABELA VII

Teste t de comparação da diferença do número de plaquetas (dPLT) para as duas variáveis estudadas, que foram: o primeiro dia e quinto dia de coleta.

Teste t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes		
	1º dia	5º dia
Stat t	0,760545548	-0,056361164
t crítico bi-caudal	2,012893674	2,012893674

No estudo da verificação da integridade funcional, a aplicação do Teste t no primeiro dia revelou que não há diferença estatisticamente significativa ao efetuar-se a comparação do VPM no tubo seco e no tubo com EDTA (tabela 8). A média obtida para o tubo com EDTA foi de 6,8458 fl, tendo um desvio padrão de $\pm 0,6639$ fl, enquanto que a média obtida para o tubo seco, foi de 6,9916, com um desvio padrão de $\pm 0,6021$ fl.

Apenas 16,6% das plaquetas responderam ao EDTA intumescendo e aumentando o seu VPM.

TABELA VIII

Teste t para comparação do VPM no primeiro dia de coleta para as amostras com e sem EDTA.

Teste t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes	
Stat t	-0,79708
t crítico bi-caudal	2,012894

TABELA VIII

Teste t para comparação do VPM plaquetário no quinto dia para as amostras com e sem EDTA.

Teste t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes	
Stat t	0,615331
t crítico bi-caudal	2,012894

A aplicação do Teste t no quinto dia revelou que não há diferença estatisticamente significativa ao efetuar-se a comparação do VPM no tubo seco e no tubo com EDTA (tabela 9). A média obtida para o tubo com EDTA foi de 7,8416, tendo um desvio padrão de $\pm 0,6645$, enquanto que a média obtida para o tubo seco foi de 7,7250, com um desvio padrão de $\pm 0,6489$. Apesar de no quinto dia também não haver diferença estatística entre as amostras, houve um aumento significativo da resposta plaquetária frente ao EDTA, pois no quinto dia 70,8% das plaquetas intumesceram na presença deste desagregante plaquetário, gerando um aumento do VPM. Esse dado vem demonstrar que a avaliação da integridade funcional é mais representativa no quinto dia após coleta, apesar de ainda não estar de acordo com as especificações da RDC.

Ao se comparar a maior resposta das plaquetas ao EDTA no quinto dia em relação ao primeiro dia, tal fato pode estar relacionado com a presença de pequenos grumos visíveis no primeiro dia da coleta, que possivelmente desencadearam um falso aumento do VPM no tubo seco, e que com o decorrer dos dias foram se dissolvendo pelo contínuo processo de homogeneização a que são submetidos às unidades plaquetárias, desde a sua coleta até a data de expiração.

A média do volume das unidades de concentrados de plaquetas foi de 65,37 ml com desvio padrão de $\pm 2,67$ ml, avaliado no primeiro dia após a coleta.

DISCUSSÃO

O modelo adotado neste estudo buscou analisar os componentes plaquetários produzidos pelo serviço de Hemoterapia de Santo Ângelo, e contribuir para a instalação do programa de controle de qualidade interno no serviço.

Assim, analisando os resultados não foi evidenciada nos concentrados plaquetários avaliados quanto à esterilidade, a presença de agentes infecciosos. Conforme relata Nascimento, 2002, os concentrados plaquetários são os componentes com maior percentagem de contaminação e com maior probabilidade de provocar reações transfusionais pelo fato de serem conservados à temperatura ambiente, por períodos de tempo até 5 dias. Apesar disto, nossos resultados nos permitem afirmar que este não é um fator de risco para a alteração da qualidade nos componentes analisados pelo serviço.

De acordo com Pisciotto *et al.*, a função plaquetária está prejudicada em níveis de pH entre 6,0-6,5. A aferição do pH dos concentrados plaquetários no primeiro e no quinto dia apresentaram resultados satisfatórios, sendo que todas (100%) as amostras obtiveram valor de pH superior a 7,4, não demonstrando comprometimento das unidades estudadas e estando conforme ao estudo de Pisciotto *et al.* e as normas estabelecidas pela RDC 343/02, que refere que o pH seja, no mínimo de 6,5 no último dia de validade do produto.

Nosso estudo determinou o pH das unidades através do método por fita Merck®. Buchignani *et al.*, mencionam que o emprego de tal fita e a respectiva marca citada, empregadas para a determinação rápida do pH, é um instrumento fidedigno, podendo ser utilizado na prática para este fim, antes da liberação da unidade de concentrados plaquetários ao paciente.

Quando verificamos a integridade funcional das plaquetas, esta nos mostrou que a avaliação no quinto dia é mais representativa, pois as plaquetas respondem melhor ao EDTA mudando sua forma de discóide para esférica e demonstrando que são funcionalmente competentes. Conforme Pires *et al.*, pelo valor da diferença do Volume Plaquetário Médio (dVPM) pode-se ter uma resposta confiável quanto a integridade funcional das plaquetas.

Quanto à verificação da presença de agregados plaquetários, constatou-se a ausência destes nas amostras avaliadas no primeiro e no quinto dia. Quando comparamos com os resultados de Abreu e Moreira, 2003, que em estudo semelhante verificaram uma diferença estatisticamente significativa no quinto dia após a coleta, traduzindo a existência de microagregação plaquetária, nossos resultados foram mais satisfatórios.

O volume da unidade plaquetária preconizado pela RDC 354/02, varia entre 50 a 70ml, dessa forma, todas as unidades avaliadas no controle de qualidade estavam adequadas. Pires *et al.* em seu estudo, encontraram médias entre 62 ml, condizente com nossos resultados. Holme *et al.*, 1994, mencionam a grande importância da conservação das plaquetas, e que, grandes volumes de plasma aumentam os riscos acidez da unidade podendo levar a ativação destas. Esta afirmação vem demonstrar a importância da coleta de volumes adequados.

Da mesma forma que Abreu e Moreira, 2003, que não evidenciaram a presença de fragmentos plaquetários nas unidades avaliadas, tal resultado também foi constatado no presente estudo.

Com relação à concentração de plaquetas, não houve diferença estatisticamente significativa ao se comparar o primeiro e o quinto dia após a coleta (com EDTA) e estando

de acordo com o preconizado pela RDC 343/02. Resultados de Abreu e Moreira, 2003, não estão de acordo com nosso estudo, pois evidenciaram concentrações muito superiores de plaquetas no quinto dia o que aumenta a exaustão metabólica das plaquetas por falta de oxigênio.

Conforme referido, as unidades plaquetárias utilizadas para controle de qualidade foram violadas. Um estudo efetuado por Abreu, 2001, veio demonstrar uma alternativa inovadora de validação de uma técnica denominada expressão da tubuladura, na realização de controle de qualidade dos concentrados plaquetários, referindo não haver nenhuma diferença estatisticamente significativa das variáveis estudadas quando comparadas com a técnica convencional, adotada no presente estudo.

CONCLUSÃO

A implantação do controle de qualidade nos Serviços de Hemoterapia tem papel relevante na obtenção de resultados confiáveis, isso se deve à possibilidade de monitorização do processo de preparação destes hemocomponentes, através de uma amostragem aleatória dos produtos finais, fazendo a comprovação da conformidade ou da não conformidade às especificações previamente estabelecidas, garantindo a qualidade, confiabilidade e a segurança transfusional.

Sob este aspecto, o controle de qualidade deve ser entendido como um processo dinâmico que permite adaptar-se às situações nos quais se realizam as atividades dispensadas aos usuários de tal serviço. Logo, é importante que a garantia da qualidade seja aplicada e reconhecida como um fundamento, uma condição técnica imprescindível em qualquer situação analítica. Tal assertiva corrobora a importância da sua implantação nos concentrados plaquetários.

Os resultados obtidos no nosso estudo demonstraram a conformidade das unidades fracionadas pelo Serviço de Hemoterapia com a legislação vigente, que preconiza que sejam avaliados a concentração plaquetária, o volume, pH a temperatura ambiente e a validade do produto no quinto dia. Recomendamos, para obtermos um controle mais rígido do processo, a execução da avaliação da presença de fragmentação plaquetária, agregação plaquetária e da integridade funcional como rotina do serviço, pois não agrega custo ao processo e otimiza as transfusões realizadas.

AGRADECIMENTOS

À equipe do Serviço de Hemoterapia do Hospital Santo Ângelo, RS, ao Laboratório de Análises Clínicas Osvaldo Cruz, de Santo Ângelo, RS, pela permissão da execução das análises laboratoriais e pela cooperação que estes dispensaram para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. ABREU J., MOREIRA RM. Avaliação da qualidade em Concentrados de Plaquetas: Estudos das possíveis causas da lesão de armazenamento. ABO. 2003; (16): 6-10.
2. ABREU, J. Validação da técnica de colheita de amostras para controle de qualidade em concentrados plaquetários e concentrados eritrocitários. ABO. 2001; (6): 28-30.
3. BRASIL, Ministério da Saúde. Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 343, de 13 de dezembro de 2002, Anexo 1- Regulamento Técnico dos serviços de Hemoterapia. Brasília: 2002.
4. BUCHIGNANI M.R. *et al.* Controle de qualidade de concentrados de plaquetas. RBAC 1998; v. 30. (3): 137-140.

5. CHAMONE, D. A. F. *et al.* Manual de transfusão sanguínea. São Paulo: Roca, 2001.
6. ENGELFRIET, C.P. *et al.* Bacterial contamination of blood components. *Vox Sang.* 2000; (78):59-67.
7. HOLME, S., *et al.* Evaluation of platelet concentrates stored for 5 days with reduced plasma volume. *Transfusion.* 1994, v. 34, p. 39-43.
8. KRAILIDSIRI J, SEGATCHIAN J. The platelet Storage lesion. *Transfusion Medicine Reviews* 1997, v. 11 (2): 130-144.
9. NASCIMENTO F. Contaminação bacteriana nos componentes do sangue. Algumas medidas preventivas. *ABO.* 2002 (10): 21-28.
10. PIRES. *et al.* Controle de Qualidade dos Concentrados Plaquetários. Experiência de um Ano no Centro Regional de Sangue de Coimbra. *ABO,* 2001. (6): 24-27.
11. PISCIOTTO *et al.* In vitro characteristics volume reduced platelet concentrate stored in syringes. *Transfusion.* 1991, v. 31, p. 404-408.
12. RIBEIRO A. A. F.; KUTNER J. M. Prevenindo a contaminação bacteriana de componentes sanguíneos. *Revista Einstein.* 2003; (1): 126-128.
13. SEGATCHIAN J. Quality monitoring of platelet concentrates: the need for standardization/harmonization of cellular content and assessment of platelet functional reserve. *Transfusion Science.* 1999, (20):189-193.
14. SWEENEY J.D, RIZ Y. *Clinical Transfusion Medicine.* Austin, USA: Landes Bioscience. 1999, 170p.

Endereço para correspondência:

Giliane Dorneles Guerin
Rua Duque de caxias, 636
Santiago-RS. Cep 99700-000.
Tel.: 55 3251-1081



Sociedade Brasileira de Análises Clínicas®

**IFCC WORLDLAB
Fortaleza - Brasil**

**20º Congresso Internacional de Bioquímica e Medicina Laboratorial
35º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas
8º Congresso Brasileiro de Citologia Clínica**

28 de setembro - 2 outubro/2008

Local:
Centro de Convenções do Ceará